

**PROCEDE DE SURPRODUCTION D'UNE PROTEINE RECOMBINANTE
DETERMINEE PAR DES SOUCHES MONOCARYOTIQUES DE *P.
CINNABARINUS***

La présente invention concerne l'utilisation de souches monocaryotiques de champignons filamenteux de l'espèce *Pycnoporus* du groupe basidiomycète, pour la mise en oeuvre d'un procédé de préparation d'une protéine recombinante déterminée, ledit procédé étant effectué par surexpression du gène codant pour cette protéine dans la souche monocaryotique susmentionnée de *Pycnoporus*.

A l'heure actuelle, deux modèles fongiques sont utilisés préférentiellement par les grands groupes industriels dans le cadre de la production d'enzymes intervenant dans les biotransformations végétales, telles que les métalloenzymes. Il s'agit d'*Aspergillus*, et de *Trichoderma*, qui appartiennent au groupe des deutéromycètes. Toutefois, les rendements de production à l'aide de ces modèles, notamment en production de laccases, n'excèdent pas les 150 mg/l.

La présente invention découle de la mise en évidence par les Inventeurs du fait que la transformation de souches monocaryotiques de *P. cinnabarinus* déficientes pour l'activité laccase à l'aide de vecteurs contenant le gène codant pour cette laccase et dont l'expression est sous le contrôle d'un promoteur identique au promoteur *pLac* endogène de la laccase de *P. cinnabarinus*, conduit à une production équivalente de laccase que lors de la mise en oeuvre d'un procédé de surproduction de laccase par induction du promoteur endogène de cette laccase par action de l'éthanol sur des souches monocaryotiques de *P. cinnabarinus* non déficientes pour l'activité laccase, et qui égale le g/l.

Des résultats similaires ont été obtenus par les Inventeurs en utilisant le promoteur *gpd*, et le promoteur *sc3* de *Schizophyllum commune*, en lieu et place du promoteur *pLac* susmentionné.

La présente invention a pour objet un procédé de préparation d'une protéine recombinante déterminée, ledit procédé étant effectué par surexpression du gène codant pour cette protéine déterminée dans une souche monocaryotique de champignons filamenteux de l'espèce *Pycnoporus* du groupe basidiomycète, et comprend :

- une étape de mise en culture de la souche monocaryotique de *Pycnoporus* susmentionnée, ladite souche étant transformée à l'aide d'un vecteur d'expression

contenant le gène codant pour la protéine recombinante déterminée, dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur correspondant à un promoteur endogène des champignons susmentionnés, ou d'un promoteur différent (encore désigné promoteur exogène), ledit promoteur étant constitutif ou inductible,

- le cas échéant une étape d'induction du promoteur susmentionné, lorsque celui-ci est inductible,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la protéine recombinante déterminée, produite dans le milieu de culture.

L'invention a plus particulièrement pour objet un procédé tel que décrit ci-dessus, caractérisé en ce que la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée pour la surexpression du gène codant pour la protéine recombinante déterminée, est telle qu'obtenue par mise en culture de la souche dicaryotique d'origine à 30°C dans le noir pendant 15 jours, suivie d'une étape d'exposition au jour 2 à 3 semaines à température ambiante jusqu'à la formation d'organes de fructification correspondant à des hyphes différenciées appelées basides, au sein desquels a alors lieu la caryogamie (fusion des noyaux), suivie de la méiose qui conduit à la formation de quatre spores sexuées, ou basidiospores haploïdes génétiquement différentes, qui, après germination, engendrent un mycélium monocaryotique.

Avantageusement, la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée dans le procédé susmentionné de l'invention, est une souche de *Pycnoporus cinnabarinus*.

Les protéines recombinantes déterminées surexprimées dans le cadre de la mise en oeuvre du procédé selon l'invention, correspondent soit à des protéines endogènes de *Pycnoporus*, soit à des protéines exogènes différentes des protéines endogènes de la souche de *Pycnoporus* utilisée pour la production desdites protéines. Notamment ces protéines exogènes correspondent à des protéines endogènes de basidiomycètes autres que *Pycnoporus*, telles que les enzymes basidiomycètes intervenant dans les biotransformations végétales, ou correspondent à des protéines endogènes de souches de *Pycnoporus* différentes de la souche de *Pycnoporus* utilisée pour la production desdites protéines.

L'invention a plus particulièrement pour objet un procédé tel que décrit ci-dessus, caractérisé en ce que les protéines recombinantes déterminées correspondent :

- aux protéines endogènes de *Pycnoporus* suivantes :

- * les métalloenzymes, telles que la laccase, ou la tyrosinase,

* ou la cellobiose déshydrogénase, la xylanase, la β -glycosidase, l'invertase, ou l' α -amylase,

- aux protéines exogènes choisies parmi les suivantes :

* les tyrosinases de souches de *Pycnoporus* différentes de la souche de *Pycnoporus* utilisée pour la production desdites protéines, telle que la tyrosinase de *Pycnoporus sanguineus* lorsque la souche de *Pycnoporus* utilisée pour la production de cette tyrosinase est différente de *Pycnoporus sanguineus*,

* les laccases de basidiomycètes autres que *Pycnoporus*, telle que la laccase d'*halocyphina villosa* (basidiomycète halophile),

* les cinnamoyl estérases A (numéro EMBL Y09330) et B (numéro EMBL ANI309807) d'*Aspergillus niger*.

Avantageusement, notamment dans le cas de la préparation de protéines recombinantes déterminées correspondant aux protéines endogènes de *Pycnoporus*, la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée est déficiente pour le gène codant pour la protéine endogène à laquelle correspond la protéine recombinante déterminée, afin de ne pas avoir à séparer la protéine recombinante déterminée de la protéine endogène à laquelle elle correspond lors de la purification de ladite protéine recombinante.

En variante, notamment dans le cas de la préparation de protéines recombinantes déterminées correspondant aux protéines endogènes de *Pycnoporus*, la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée peut ne pas être déficiente pour le gène codant pour la protéine endogène à laquelle correspond la protéine recombinante déterminée, ladite souche étant alors transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour la protéine recombinante déterminée marquée afin de la distinguer de la protéine endogène lors de l'étape de purification. A titre d'illustration, la protéine recombinante déterminée peut être marquée par une étiquette histidine (His-tag).

A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet un procédé de préparation de laccases recombinantes correspondant aux laccases endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour une laccase de *Pycnoporus*, le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur correspondant au promoteur endogène de cette laccase,

- une étape d'induction du promoteur susmentionné, notamment par addition d'éthanol, ou de sous-produits agricoles contenant de la lignocellulose comme la paille de blé, les sons de maïs et la pulpe de betterave, ou des composés à cycle aromatique comme la 2,5-xylidine, l'acide vératrylique, le guaïcol, l'alcool vératrylique, la syringaldazine, l'acide férulique, l'acide caféique et les lignosulfonates,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus* susmentionnée produite dans le milieu de culture, notamment selon la méthode décrite dans Sigoillot J.C., Herpoel I., Frasse P., Moukha S., Lesage-Meessen L., Asther M. 1999 ; Laccase production by a monokaryotic strain *Pycnoporus cinnabarinus* derived from a dikaryotic strain ; World Journal of Microbiology and Biotechnology 15, 481-484.

L'invention concerne plus particulièrement un procédé tel que défini ci-dessus, de préparation de la laccase recombinante correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus* représentée par SEQ ID NO : 2, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus cinnabarinus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence nucléotidique (ou acide nucléique) SEQ ID NO : 1 codant pour la laccase recombinante représentée par SEQ ID NO : 2, le cas échéant marquée, notamment par une étiquette His-tag, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur *pLac* correspondant au promoteur endogène de la laccase susmentionnée, la séquence dudit promoteur *pLac* étant représentée par SEQ ID NO : 3,

- une étape d'induction par l'éthanol du promoteur *pLac* susmentionné,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, représentée par SEQ ID NO : 2 produite dans le milieu de culture, notamment selon la méthode décrite dans Sigoillot J.C., et al. (1999) susmentionné.

L'invention a plus particulièrement pour objet un procédé de préparation de laccases recombinantes correspondant aux laccases endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour une laccase

de *Pycnoporus* dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur exogène choisi parmi :

- * le promoteur *gpd* de l'expression du gène codant pour la glycéraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase de *Schizophyllum commune*, dont la séquence nucléotidique est représentée par SEQ ID NO : 4,

- * ou le promoteur *sc3* de l'expression du gène codant pour l'hydrophobine de *Schizophyllum commune*, dont la séquence nucléotidique est représentée par SEQ ID NO : 5,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus* susmentionnée produite dans le milieu de culture, notamment selon la méthode décrite dans Sigoillot J.C., et al. (1999) susmentionné.

L'invention concerne plus particulièrement un procédé tel que défini ci-dessus, de préparation de la laccase correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus* représentée par SEQ ID NO : 2, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus cinnabarinus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant pour la laccase recombinante représentée par SEQ ID NO : 2, le cas échéant marquée, notamment par une étiquette His-tag, dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur exogène *gpd* ou *sc3*,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, représentée par SEQ ID NO : 2 produite dans le milieu de culture, notamment selon la méthode décrite dans Sigoillot J.C., et al. (1999) susmentionné.

L'invention a plus particulièrement pour objet un procédé tel que défini ci-dessus, de préparation de tyrosinase recombinante correspondant à la tyrosinase de *Pycnoporus sanguineus* représentée par SEQ ID NO : 16, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus cinnabarinus* transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 15 codant pour la tyrosinase recombinante représentée par SEQ ID NO : 16, le cas échéant marquée, la séquence SEQ ID NO : 15 étant avantageusement précédée par la séquence nucléotidique délimitée par les nucléotides situés aux positions 128 et 190 de SEQ ID NO : 1 codant pour le peptide signal de *Pycnoporus cinnabarinus* délimité par les 21 premiers aminoacides de SEQ ID NO : 2,

et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur *pLac* correspondant au promoteur endogène de la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus*, la séquence dudit promoteur *pLac* étant représentée par SEQ ID NO : 3,

- une étape d'induction par l'éthanol du promoteur *pLac* susmentionné,
- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la tyrosinase recombinante, le cas échéant marquée, représentée par SEQ ID NO : 16 produite dans le milieu de culture.

L'invention concerne plus particulièrement un procédé tel que défini ci-dessus, de préparation de laccase recombinante correspondant à la laccase d'*halocyphina villosa* représentée sur la figure 12 (SEQ ID NO : 18), caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus cinnabarinus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence nucléotidique représentée sur la figure 12 (SEQ ID NO : 17) codant pour la laccase recombinante représentée par SEQ ID NO : 18, le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur *pLac* correspondant au promoteur endogène de la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus*, la séquence dudit promoteur *pLac* étant représentée par SEQ ID NO : 3,

- une étape d'induction par l'éthanol du promoteur *pLac* susmentionné,
- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, représentée par SEQ ID NO : 18 produite dans le milieu de culture.

L'invention a également pour objet la séquence nucléotidique codant pour le promoteur *pLac* de la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus*, et correspondant à la séquence SEQ ID NO : 3, ou toute séquence dérivée de ce promoteur par substitution, addition ou suppression d'un ou plusieurs nucléotides et conservant la propriété d'être un promoteur de l'expression de séquences.

L'invention concerne également tout vecteur d'expression, tel que le plasmide pELP, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence SEQ ID NO : 3 du promoteur *pLac* susmentionné, ou une séquence dérivée telle que définie ci-dessus.

L'invention a plus particulièrement pour objet tout vecteur d'expression tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend un gène codant pour une protéine recombinante déterminée, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur *pLac* susmentionné, ou d'une séquence dérivée telle que définie ci-dessus.

L'invention concerne plus particulièrement tout vecteur d'expression tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que la protéine recombinante déterminée est une protéine correspondant :

- aux protéines endogènes de *Pycnoporus* suivantes :
 - * les métalloenzymes, telles que la laccase, ou la tyrosinase,
 - * ou la cellobiose déshydrogénase, la xylanase, la β -glycosidase, l'invertase, ou l' α -amylase,
- aux protéines exogènes choisies parmi les suivantes :
 - * les tyrosinases de souches de *Pycnoporus* différentes de la souche de *Pycnoporus* utilisée pour la production desdites protéines, telle que la tyrosinase de *Pycnoporus sanguineus* lorsque la souche de *Pycnoporus* utilisée pour la production de cette tyrosinase est différente de *Pycnoporus sanguineus*,
 - * les laccases de basidiomycètes autres que *Pycnoporus*, telle que la laccase d'*halocyphina villosa* (basidiomycète halophile),
 - * les cinnamoyl estérases A et B d'*Aspergillus niger*.

L'invention concerne également toute cellule hôte transformée à l'aide d'un vecteur d'expression tel que défini ci-dessus.

L'invention a plus particulièrement pour objet toute cellule hôte susmentionnée, correspondant à des cellules monocaryotiques de souches de *Pycnoporus*, telles que les souches de *Pycnoporus cinnabarinus*.

L'invention a également pour objet l'utilisation de vecteurs d'expression tels que définis ci-dessus, ou de cellules hôtes susmentionnées, pour la mise en oeuvre d'un procédé de surproduction d'une protéine recombinante déterminée telle que définie ci-dessus.

L'invention sera davantage illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit du SEPC : Système d'Expression *Pycnoporus cinnabarinus*, à savoir du développement d'un modèle d'expression fongique performant permettant de s'affranchir des modèles industriels utilisés actuellement par les grands groupes européens (*Aspergillus* et *Trichoderma*).

En résumé, il s'agit d'un système d'expression eucaryote et plus spécifiquement de champignon filamenteux du groupe basidiomycète, *Pycnoporus cinnabarinus*, qui a été développé par les Inventeurs pour la surexpression de protéines d'intérêt industriel. Ce travail a été fait dans le cadre de l'étude de métalloenzymes, telles que les laccases, et en particulier a permis de cloner les gènes impliqués pour leur surexpression, et de

surproduction des laccases en grande quantité à l'aide de fermenteurs, ceci afin de les utiliser dans des applications industrielles à usage alimentaire (panification, préparation de boissons afin de moduler la couleur du thé, aider à la clarification des jus de fruits et des boissons alcoolisées, formation d'agropolymères) et non alimentaire (traitement des « jeans », dégradation de polluants aromatiques dans les sols, bioblanchiment des fibres lignocellulosiques dans le domaine des pâtes à papier).

I) Obtention de lignées monocaryotiques de *Pycnoporus cinnabarinus* pour la transformation du champignon et la surproduction de gènes d'intérêt.

Cette étape a pour but d'isoler puis de sélectionner des lignées cellulaires haploïdes issues des spores sexuées d'un champignon filamenteux, *Pycnoporus cinnabarinus*, qui seront utilisées en temps qu'hôte pour l'expression des gènes d'intérêt. *P. cinnabarinus* est un champignon hétérothallique qui se trouve à l'état sauvage sous forme dicaryotique (deux noyaux non appariés par cellule) à partir duquel des lignées monocaryotiques sont sélectionnées (un noyau par cellule), potentiellement plus stable et donc utilisable pour la transformation génétique. Dans le cadre de cette étude les Inventeurs se sont attachés à sélectionner de lignées monocaryotiques déficientes pour l'activité laccase (lac⁻). A l'état dicaryotique, le champignon peut se multiplier par voie végétative (Fig. 1). Mais, sous l'influence de conditions environnementales particulières, on peut induire, en laboratoire, la formation d'organes de fructification. Au sein d'hyphes différenciées appelées basides, a alors lieu la caryogamie (fusion des noyaux), suivie de la méiose qui conduit à la formation de quatre spores sexuées, ou basidiospores haploïdes génétiquement différentes. Après germination, chaque basidiospore engendre un mycélium monocaryotique. Un simple test colorimétrique permet ensuite de ne sélectionner que les souches dépourvues d'activité laccase.

1) Isolement des souches monocaryotiques

Le milieu de fructification est composé d'extrait de malt 2% (P/V) et de l'agar (1,6% P/V). Les cultures sontensemencées dans des boîtes de Pétri et gardées à 30°C dans le noir pendant 15 jours avant de les exposer au jour 2 à 3 semaines à température ambiante. Le corps de fructification apparaît orange-rouge. Les monospores sont alors récoltées avec de l'eau stérile sur le couvercle de la boîte de Pétri. La suspension est

diluée et mise en culture dans des boîtes de Pétri contenant un milieu MA2 (malt 2% P/V et agar 2% P/V) dans le but d'isoler des colonies. Des cultures pures isolées sont piquées et gardées dans du milieu MA2 à 30°C pendant 5 jours et stockées à 4°C.

Dans ces conditions, une souche monocaryotique déficiente pour l'activité laccase a été sélectionnée pour la transformation avec le vecteur d'expression dans le but de surexprimer le gène de la laccase. Une étude en Southern blot a été effectuée et a permis de démontrer que cette souche est déficiente pour le gène codant pour la laccase chez *P. cinnabarinus*.

2) Test rapide de détection de l'activité laccase des colonies monospores

Un morceau de mycélium est déposé dans une boîte de Petri et recouvert d'une goutte de syringaldazine 0,1% (P/V) en solution éthanolique ; Après 15 minutes, un changement de couleur est observé. Le 2,2-azino-bis-[3-ethylthiazoline-6-sulfonate] (ABTS) peut-être utilisé également comme substrat pour révéler une activité laccase.

3) Conditions de cultures pour produire la laccase

Un inoculum est prélevé des précultures qui ont poussé 10 jours à 30°C dans des fioles de Roux contenant 200 mL d'un milieu synthétique avec la composition suivante pour 1L : maltose (20 g), tartrate de diammonium (1,84 g), tartrate de disodium (2,3 g), KH_2PO_4 (1,33 g), CaCl_2 , H_2O (0,1 g), MgSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g), FeSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$ (0,07 g), ZnSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$ (0,046 g), MnSO_4 , H_2O (0,035 g), CuSO_4 , $5\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g), extrait de levure (1 g), solution de vitamines (1 mL/L) selon Tatum et al. (Biochemical mutant strains of *Neurospora* produced by physical and chemical treatment. American Journal of Botany, 37 : 38-46, 1950). Le mycélium de deux fioles est collecté, mélangé à 100 mL d'eau stérile et broyés au mixeur Ultraturax 60 sec. Pour produire de la laccase, le milieu synthétique est inoculé par 1 mL de la suspension de mycélium. Le milieu (100 mL) est ensuite incubé à 30°C dans des fioles erlenmeyer bafflées de 250 mL sous agitation (120 rpm).°

II) Clonage du gène codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* et de son promoteur en vue de la construction d'un vecteur d'expression

Il s'agit d'un système d'expression eucaryote et plus particulièrement de champignon filamenteux, *Pycnoporus cinnabarinus*, du groupe basidiomycète pour la

surproduction de protéines recombinantes déterminées. Le modèle d'étude sélectionné est celui de la laccase de *P. cinnabarinus*. A l'heure actuelle, deux modèles fongiques sont utilisés préférentiellement par les grands groupes industriels. Il s'agit d'*Aspergillus* et de *Trichoderma* qui appartiennent au groupe des Deutéromycètes. Ce système d'expression est donc tout à fait original et devrait combler la lacune concernant le développement de système d'expression basidiomycète compatible avec les exigences des industriels (possibilité de production à grande échelle de protéines sécrétées dans le milieu extra-cellulaire et culture du champignon producteur en fermenteur).

1) *Clonage de gène de la laccase de Pycnoporus cinnabarinus et de son promoteur*

Dans une première étape, les Inventeurs ont amplifié un fragment du gène codant pour la laccase à l'aide d'amorces nucléotidiques dégénérées (Fig. 2). Les amorces dégénérées amont F2 (SEQ ID NO : 6 ; CAYTGGCAYGGRTTCTTCC) et aval R8 (SEQ ID NO : 7 ; GAGRTGGAAGTCRATGTGRC) ont été déduites, respectivement, des régions de liaison au cuivre I et IV des laccases d'organismes voisins et utilisées dans une réaction de PCR (Polymerase Chain Reaction) en utilisant l'ADN génomique de *P. cinnabarinus* I-937. A 10 µl de mélange réactionnel sont ajoutés : 100 ng d'ADN génomique; 0.2 mM de dATP, dCTP, dTTP, and dGTP; 25 pmol de chaque amorce nucléotidique; 0.1 volume de tampon 10X *Pfu* polymerase (100 mM Tris-HCl, 15mM MgCl₂, 500 mM KCl, pH 8,3) and 1 U de polymerase *Pfu*. Le mélange est chauffé à 94°C pendant 5 min avant d'ajouter la polymérase. Les conditions de la réaction sont les suivantes : 5 cycles de 94 °C, 5 min; 55 °C, 30 s; et 72 °C, 4 min; puis 25 cycles of 94 °C, 30 s; 55 °C, 30 s, et 72 °C, 3 min. Une étape de 10 min à 72°C est effectuée afin de finir la réaction. Une bande de 1,64 kpb a été obtenue correspondant à la partie centrale du gène de la laccase. La séquence ADN a été clonée dans pGEM-T afin de séquencer cette partie du gène.

Par une technique de Southern blot (Fig. 3), nous avons défini les sites de restriction appropriés afin d'obtenir un fragment d'ADN minimum, pouvant contenir l'intégralité de gène de la laccase, et qui sont susceptibles de servir à amplifier les extrémités 5' et 3' manquantes. Un Southern blot a été effectué avec l'ADN génomique de *P. cinnabarinus* avec les enzymes, *Bam*HI, *Eco*RI, *Pst*I, *Pvu*II, *Sac*I, *Sma*I and *Xba* I et a permis de sélectionner *Pst*I qui donne une bande de 3.5 kpb par digestion de l'ADN génomique. Afin d'amplifier les parties manquantes du gène, une technique de PCR

inverse a été utilisée avec un mélange de PCR contenant des amorces nucléotidiques spécifiques de la partie centrale précédemment isolée et de l'ADN génomique de *P. cinnabarinus*. La réaction de PCR est effectuée avec 150 ng d'ADN coupé par *Pst*I et recircularisé sur lui-même par ligation et les amorces nucléotidiques Fex (SEQ ID NO : 8 ; GGATAACTACTGGATCCGCG) et Rex (SEQ ID NO : 9 ; CGCAGTATTGCGTGGAGAG). Les conditions de la réaction sont les suivantes : 5 cycles de 94 °C, 5 min; 55 °C, 30 s; et 72 °C, 5 min; puis 25 cycles of 94 °C, 30 s; 55 °C, 30 s, et 72 °C, 4 min avec une étape finale de 10 min à 72 °C. Le fragment d'ADN amplifié correspond à une bande de 2,7 kpb qui a été cloné dans pGEM-T et séquencé.

L'intégralité du gène codant pour la laccase a été ensuite définie en combinant la partie centrale et les parties 5' et 3' amplifiées. Afin de vérifier cette séquence, l'intégralité du gène a été amplifié (3,331 kpb, Fig. 4) avec les amorces nucléotidiques Fin (SEQ ID NO : 10 ; GACATCTGGAGCGCCTGTC) et Rin (SEQ ID NO : 11 ; ATCGAAGGTTCCGATGACTGACATGAC) à partir de l'ADN génomique de *P. cinnabarinus*. Ce gène a été également cloné à partir de l'ADN génomique de *P. cinnabarinus* ss3 et s'est avéré être identique à celui isolé chez *P. cinnabarinus* I-937.

2) Construction du vecteur d'expression utilisant le promoteur du gène de la laccase

A partir de la séquence du gène de la laccase, les Inventeurs ont cloné le promoteur de ce gène en utilisant la même stratégie employée précédemment pour l'isolement du gène, c'est-à-dire avec une technique de PCR inverse sur un fragment d'ADN génomique (3,5 kpb) coupé cette fois-ci par l'enzyme de restriction *Bgl*III (Fig. 5). Deux mille cinq cent vingt sept kpb en avant du gène de la laccase ont été ainsi cloné par PCR inverse et séquencé. Ce promoteur a été placé dans un vecteur une résistance à l'ampicilline pour son sous-clonage dans la bactérie et une résistance à la phléomycine utilisé comme marqueur de sélection dans le champignon. Un terminateur du gène codant pour l'hydrophobine sc3 de *Schizophyllum commune* a été placé en aval afin de terminer l'étape de transcription. Ce vecteur appelé pELP sera utilisé pour l'expression homologue de la laccase (Fig. 6). Deux autres promoteurs hétérologues ont été utilisés dans cette étude. Ce sont les promoteurs des gènes codant pour la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (gpd) et l'hydrophobine (sc3) de *Schizophyllum commune*

(Fig. 6), constituant respectivement les vecteurs d'expression pEGT et pESC. L'intégralité des séquences nucléotidiques de vecteurs pEGT (SEQ ID NO : 12), pESC (SEQ ID NO : 13), et pELP (SEQ ID NO : 14), se trouvent dans les figures 7, 8 et 9 avec les positions du promoteur, du marqueur de sélection et du terminateur.

III) Transformation de la souche monocaryotique avec les vecteurs d'expression (modèle d'étude : la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus*)

1) Préparation du mycélium pour l'obtention de protoplastes

Un quart d'une colonie cultivée en milieu solide (10 jours) est homogénéisé avec un mixeur (type Ultraturax, vitesse lente) pendant une minute dans 50 ml de milieu YM (par litre : glucose 10 g, peptone 5 g, extrait de levure 3 g, extrait de malt 3 g). Le broyat est transféré dans un erlenmeyer de 250 ml stérile où l'on rajoute 50 ml de milieu YM, puis incubé à 30°C et sous agitation (225 rpm) pendant 20 heures. La culture est une nouvelle fois homogénéisée pendant 1 min (vitesse lente) et on rajoute 100 ml de milieu YM. Le broyat est transféré dans un erlenmeyer de 500 ml et mis en culture pendant une nuit à 30°C.

2) Préparation des protoplastes

La culture de champignon est centrifugée pendant 10 min à 2000 rpm dans un rotor oscillant (tube de 50 ml). Seize g (poids humide) sont lavés dans 40 ml d'une solution de $MgSO_4$ 0,5 M ou de saccharose 0,5 M. Dans le cas de l'utilisation du saccharose, l'enzyme lytique utilisée pour digérer les parois est diluée dans le saccharose. Le mycélium est ensuite centrifugé 10 min à 2000 rpm et le surnageant éliminé. Concernant la lyse des parois fongiques, on ajoute au mycélium provenant de 50 ml de culture, 10 ml d'enzyme lytique (Glucanex, Sigma) dilué à 1 mg/ml dans une solution de $MgSO_4$ 0,5 M. La digestion se fait dans un erlenmeyer de 500 ml à 30°C sous faible agitation pendant 3 à 4 heures. Pendant cette incubation, l'apparition des protoplastes est contrôlée au microscope. Dix ml d'eau stérile sont rajoutés, puis mélangés délicatement. Les protoplastes sont laissés 10 min, le temps que l'équilibre avec l'eau se fasse (les protoplastes vont flotter à la surface). Ils sont ensuite centrifugés 10 min à 2000 rpm dans un rotor oscillant. Le surnageant contenant les protoplastes est transféré délicatement dans un nouveau de 50 ml. Le culot restant peut-être re-incubé avec 25 ml d'une solution de $MgSO_4$ 0,5M pour récupérer le maximum de protoplastes

(on répète alors l'étape de centrifugation). Un volume de sorbitol 1 M, égal à celui de la préparation des protoplastes, lui est rajouté. Pendant 10 min, on laisse les protoplastes relarguer l'eau. Cette préparation est ensuite centrifugée 10 min à 2000 rpm. Le surnageant est éliminé, tout en laissant un peu de sorbitol. Les protoplastes sont transférés dans un nouveau tube. Le précédent tube est rincé avec la solution de sorbitol 1M et les protoplastes récupérés, ajoutés dans le nouveau tube. Les protoplastes sont comptés et centrifugés 10 min à 2000 rpm. Ils sont ensuite dilués à une concentration de $2 \cdot 10^7$ protoplastes par ml dans la solution de sorbitol 1M. Une solution de CaCl_2 à 0,5 M (1/10) est rajoutée aux protoplastes.

3) Transformation des protoplastes

Pour la transformation, 100 μl de protoplastes sont transformés avec 5 à 10 μg de vecteur (volume maximum de 10 μl) dans un tube stérile de 10 ml. Ils sont alors incubés 10 à 15 min dans la glace. Un volume d'une solution de PEG 4000 à 40% est ajouté, puis mélangé et les protoplastes sont incubés 5 min à température ambiante. Deux et demi ml de milieu de régénération (pour 100 ml : glucose 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12,5 g, KH_2PO_4 0,046 g, K_2HPO_4 0,1 g, bacto peptone 0,2 g, extrait de levure 0,2 g) sont rajoutés aux protoplastes qui sont incubés une nuit à 30°C. Des boîtes de sélection (milieu YM contenant de la phléomycine à 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$, boîtes carrées) sont préchauffées à 37°C. Sept et demi ml d'un mélange de top agar (Low Melting Point agarose 1% dilué dans un milieu YM contenant de la phléomycine 7 à 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sont ajoutés au milieu de régénération contenant les protoplastes et sont versés sur les boîtes de sélection préchauffées. Quand la solution de top agar s'est solidifiée, les boîtes sont incubées à 30°C pendant 4 jours. Les transformants sont alors transférés sur de nouvelles boîtes de sélection.

4) Ciblage des transformants

A partir de 16 g de mycélium, on obtient généralement de l'ordre de 1 à $2 \cdot 10^7$ protoplastes. Le pourcentage de régénération est de 10 %. Concernant le vecteur pESC, les monokaryons ont été transformés avec le vecteur contenant le cDNA (BRFM 472, 473 et 474) ou le gène codant pour la laccase de *P. cinnabarinus* (BRFM 470 et 471) (Fig. 10). En parallèle, d'autres monokaryons ont été transformés avec les promoteurs pEGT (GPD11, 12 et 13) ou avec le vecteur pELP (12.3, 12.7 et 12.8) contenant le gène

codant pour la laccase (Fig. 10). Au vu des résultats deux transformants se dégagent du lot avec des activités équivalentes, les transformants 12.7 et GPD14. L'activité au cours du temps a été suivie pour les transformants GPD14 et 12.7 (Fig. 11). L'activité est détectable à partir de 3-4 jours et augmentent jusqu'à 12 jours pour atteindre approximativement 1200 nkatal/ml soit 72000 U/l avec ajout d'éthanol dans le milieu de culture.

Légende des figures

Figure 1 : Isolement de souche monocaryotique déficiente pour l'activité laccase.

Figure 2 : Isolement du gène codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* laccase.

Figure 3 : Etude en Southern blot du gène codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus*.

Figure 4 : Séquence du gène codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus*.

Figure 5 : Séquence de la séquence promotrice pLac du gène codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* (jusqu'à l'ATG codant pour la méthionine de la laccase).

Figure 6 : Carte physique des trois vecteurs d'expression pEGT, pESC, pELP, utilisés pour la production de la laccase chez *Pycnoporus cinnabarinus*.

Figure 7 : Séquence nucléotidique du vecteur pEGT, contenant le promoteur du gène *gpd* (4480-5112), un marqueur de résistance à la phléomycine (507-1822) et le terminateur du gène *sc3* (71-507).

Figure 8 : Séquence nucléotidique du vecteur pESC, contenant le promoteur du gène *sc3* (1-1033), un marqueur de résistance à la phléomycine (1540-2855) et le terminateur du gène *sc3* (1104-1540).

Figure 9 : Séquence nucléotidique du vecteur pELP, contenant le promoteur du gène laccase (4457-6983), un marqueur de résistance à la phléomycine (507-1822) et le terminateur du gène sc3 (71-507)

Figure 10 : Résultats de production des transformants présentant les activités les plus importantes. La culture a été effectuée avec ou sans (témoin) éthanol.

Figure 11 : Suivi des activités laccase des transformants GPD 14 et 12.7 en fonction du temps avec ou (témoin) sans éthanol.

Figure 12 : Séquence du gène codant pour la laccase d'*halocyphina villosa*.

REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation d'une protéine recombinante déterminée, ledit procédé étant effectué par surexpression du gène codant pour cette protéine déterminée dans une souche monocaryotique de champignons filamenteux de l'espèce *Pycnoporus* du groupe basidiomycète, et comprend :

- une étape de mise en culture de la souche monocaryotique de *Pycnoporus* susmentionnée, ladite souche étant transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour la protéine recombinante déterminée, dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur correspondant à un promoteur endogène des champignons susmentionnés, ou d'un promoteur différent (encore désigné promoteur exogène), ledit promoteur étant constitutif ou inductible,

- le cas échéant une étape d'induction du promoteur susmentionné, lorsque celui-ci est inductible,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la protéine recombinante déterminée, produite dans le milieu de culture.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée pour la surexpression du gène codant pour la protéine recombinante déterminée est telle qu'obtenue par mise en culture de la souche dicaryotique d'origine à 30°C dans le noir pendant 15 jours, suivie d'une étape d'exposition au jour 2 à 3 semaines à température ambiante jusqu'à la formation d'organes de fructification correspondant à des hyphes différenciées appelées basides, au sein desquels a alors lieu la caryogamie, suivie de la méiose qui conduit à la formation de quatre spores sexuées, ou basidiospores haploïdes génétiquement différentes, qui, après germination, engendre un mycélium monocaryotique.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée est une souche de *Pycnoporus cinnabarinus*.

4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les protéines recombinantes déterminées surexprimées correspondent à des protéines endogènes de *Pycnoporus*, ou à des protéines exogènes, notamment à des protéines exogènes

correspondant à des protéines endogènes de basidiomycètes autres que *Pycnoporus*, telles que les enzymes basidiomycètes intervenant dans les biotransformations végétales, ou correspondant à des protéines endogènes de souches de *Pycnoporus* différentes de la souche de *Pycnoporus* utilisée pour la production desdites protéines.

5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les protéines recombinantes déterminées correspondent :

- aux protéines endogènes de *Pycnoporus* suivantes :

- * les métalloenzymes, telles que la laccase, ou la tyrosinase,

- * ou la cellobiose déshydrogénase, la xylanase, la β -glycosidase, l'invertase, ou l' α -amylase,

- aux protéines exogènes choisies parmi les suivantes :

- * les tyrosinases de souches de *Pycnoporus* différentes de la souche de *Pycnoporus* utilisée pour la production desdites protéines, telle que la tyrosinase de *Pycnoporus sanguineus* lorsque la souche de *Pycnoporus* utilisée pour la production de cette tyrosinase est différente de *Pycnoporus sanguineus*,

- * les laccases de basidiomycètes autres que *Pycnoporus*, telle que la laccase d'*halocyphina villosa* (basidiomycète halophile),

- * les cinnamoyl estérases A et B d'*Aspergillus niger*.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, de préparation de protéines recombinantes déterminées correspondant aux protéines endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce que la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée est déficiente pour le gène codant pour la protéine endogène à laquelle correspond la protéine recombinante déterminée.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, de préparation de protéines recombinantes déterminées correspondant aux protéines endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce que la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée est transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour la protéine recombinante déterminée marquée, notamment par un marqueur histidine.

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, de préparation de laccases recombinantes correspondant aux laccases endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour une laccase de *Pycnoporus*, le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur correspondant au promoteur endogène de cette laccase,

- une étape d'induction du promoteur susmentionné, notamment par addition d'éthanol, ou de sous-produits agricoles contenant de la lignocellulose comme la paille de blé, les sons de maïs et la pulpe de betterave, ou des composés à cycle aromatique comme la 2,5-xylidine, l'acide vératrylique, le guaïcol, l'alcool vératrylique, la syringaldazine, l'acide férulique, l'acide caféique et les lignosulfonates,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus* susmentionnée produite dans le milieu de culture.

9. Procédé selon la revendication 8, de préparation de la laccase recombinante correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus* représentée par SEQ ID NO : 2, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus cinnabarinus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant pour la laccase recombinante représentée par SEQ ID NO : 2, le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur *pLac* correspondant au promoteur endogène de la laccase susmentionnée, la séquence dudit promoteur *pLac* étant représentée par SEQ ID NO : 3,

- une étape d'induction par l'éthanol du promoteur *pLac* susmentionné,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, représentée par SEQ ID NO : 2 produite dans le milieu de culture.

10. Procédé de préparation de laccases recombinantes correspondant aux laccases endogènes de *Pycnoporus* selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour une laccase de *Pycnoporus*, le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur exogène choisi parmi :

* le promoteur *gpd* de l'expression du gène codant pour la glycéraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase de *Schizophyllum commune*, dont la séquence nucléotidique est représentée par SEQ ID NO : 4,

* ou le promoteur *sc3* de l'expression du gène codant pour l'hydrophobine de *Schizophyllum commune*, dont la séquence nucléotidique est représentée par SEQ ID NO : 5,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus* susmentionnée produite dans le milieu de culture.

11. Procédé selon la revendication 10, de préparation de la laccase recombinante correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus* représentée par SEQ ID NO : 2, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus cinnabarinus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant pour la laccase recombinante représentée par SEQ ID NO : 2 le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur exogène *gpd* ou *sc3*,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, représentée par SEQ ID NO : 2 produite dans le milieu de culture.

12. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, de préparation de tyrosinase recombinante correspondant à la tyrosinase de *Pycnoporus sanguineus* représentée par SEQ ID NO : 16, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus cinnabarinus* transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 15 codant pour la tyrosinase recombinante représentée par SEQ ID NO : 16, le cas échéant marquée, la séquence SEQ ID NO : 15 étant

avantageusement précédée par la séquence nucléotidique délimitée par les nucléotides situés aux positions 128 et 190 de SEQ ID NO : 1 codant pour le peptide signal de *Pycnoporus cinnabarinus* délimité par les 21 premiers aminoacides de SEQ ID NO : 2, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur *pLac* correspondant au promoteur endogène de la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus*, la séquence dudit promoteur *pLac* étant représentée par SEQ ID NO : 3,

- une étape d'induction par l'éthanol du promoteur *pLac* susmentionné,
- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la tyrosinase recombinante, le cas échéant marquée, représentée par SEQ ID NO : 16 produite dans le milieu de culture.

13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, de préparation de laccase recombinante correspondant à la laccase d'*halocyphina villosa* représentée sur la figure 12 (SEQ ID NO : 18), caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus cinnabarinus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence nucléotidique représentée sur la figure 12 (SEQ ID NO : 17) codant pour la laccase recombinante représentée par SEQ ID NO : 18, le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur *pLac* correspondant au promoteur endogène de la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus*, la séquence dudit promoteur *pLac* étant représentée par SEQ ID NO : 3,
- une étape d'induction par l'éthanol du promoteur *pLac* susmentionné,
- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, représentée par SEQ ID NO : 18 produite dans le milieu de culture.

14. Séquence nucléotidique codant pour le promoteur *pLac* de la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus*, et correspondant à la séquence SEQ ID NO : 3, ou toute séquence dérivée de ce promoteur par substitution, addition ou suppression d'un ou plusieurs nucléotides et conservant la propriété d'être un promoteur de l'expression de séquences.

15. Vecteur d'expression caractérisé en ce qu'il comprend la séquence SEQ ID NO: 3 du promoteur *pLac* selon la revendication 14.

16. Vecteur d'expression selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il comprend un gène codant pour une protéine recombinante déterminée, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur *pLac* selon la revendication 14.

17. Vecteur d'expression selon la revendication 15 ou 16, caractérisé en ce que la protéine recombinante déterminée est une protéine correspondant :

- aux protéines endogènes de *Pycnoporus* suivantes :

- * les métalloenzymes, telles que la laccase, ou la tyrosinase,

- * ou la cellobiose déshydrogénase, la xylanase, la β -glycosidase, l'invertase, ou l' α -amylase,

- aux protéines exogènes choisies parmi les suivantes :

- * les tyrosinases de souches de *Pycnoporus* différentes de la souche de *Pycnoporus* utilisée pour la production desdites protéines, telle que la tyrosinase de *Pycnoporus sanguineus* lorsque la souche de *Pycnoporus* utilisée pour la production de cette tyrosinase est différente de *Pycnoporus sanguineus*,

- * les laccases de basidiomycètes autres que *Pycnoporus*, telle que la laccase d'*halocyphina villosa* (basidiomycète halophile),

- * les cinnamoyl estérases A et B d'*Aspergillus niger*.

18. Cellule hôte transformée à l'aide d'un vecteur d'expression selon l'une des revendications 15 à 17.

19. Cellule hôte selon la revendication 18, correspondant à des cellules monocaryotiques de souches de *Pycnoporus*, telles que les souches de *Pycnoporus cinnabarinus*.

20. Utilisation de vecteurs d'expression selon l'une des revendications 15 à 17, ou de cellules hôtes selon la revendication 18 ou 19, pour la mise en oeuvre d'un procédé de surproduction d'une protéine recombinante déterminée selon l'une des revendications 1 à 13.

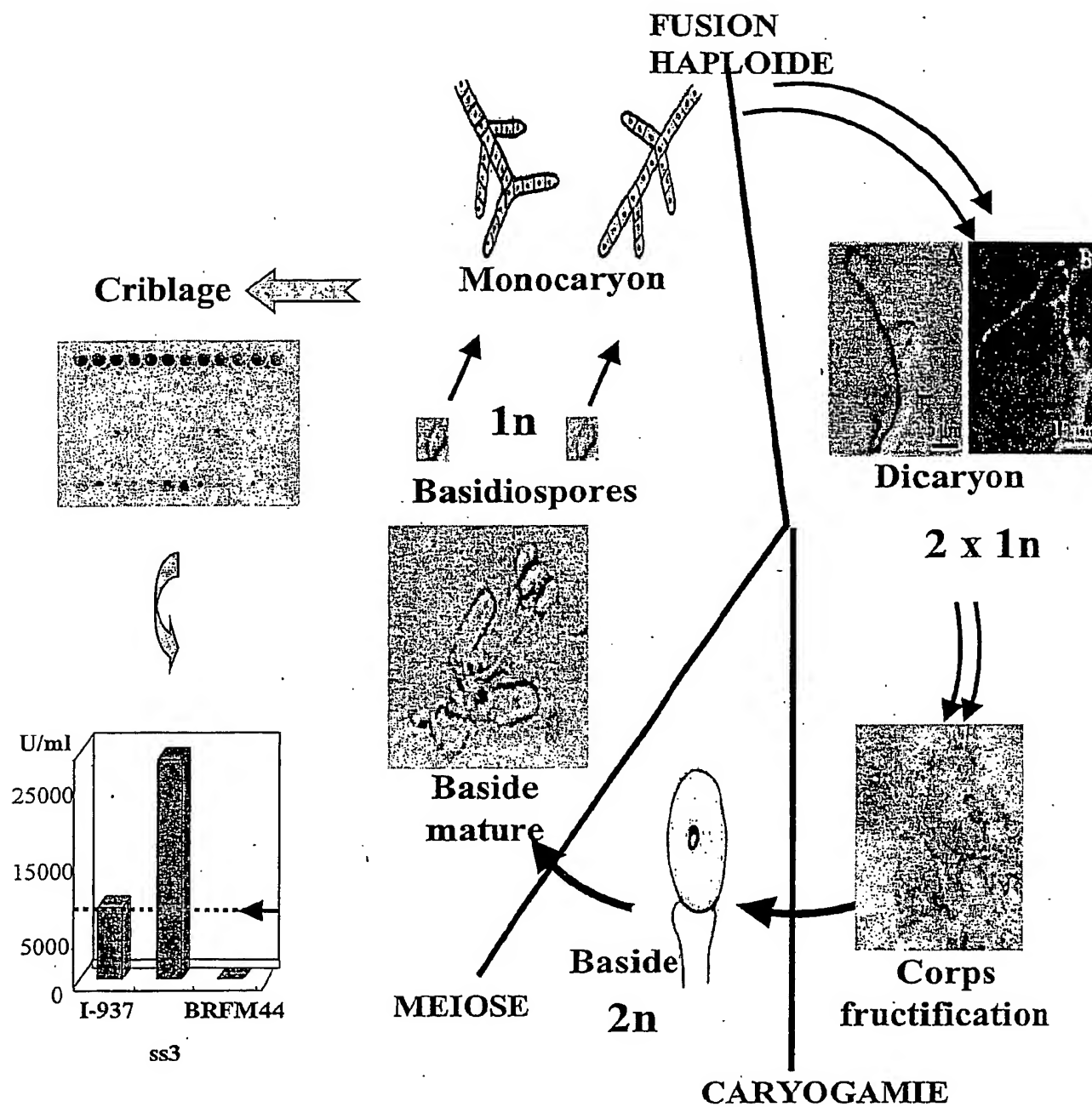


Figure 1 : Isolement de souche monocaryotique déficiente pour l'activité laccase

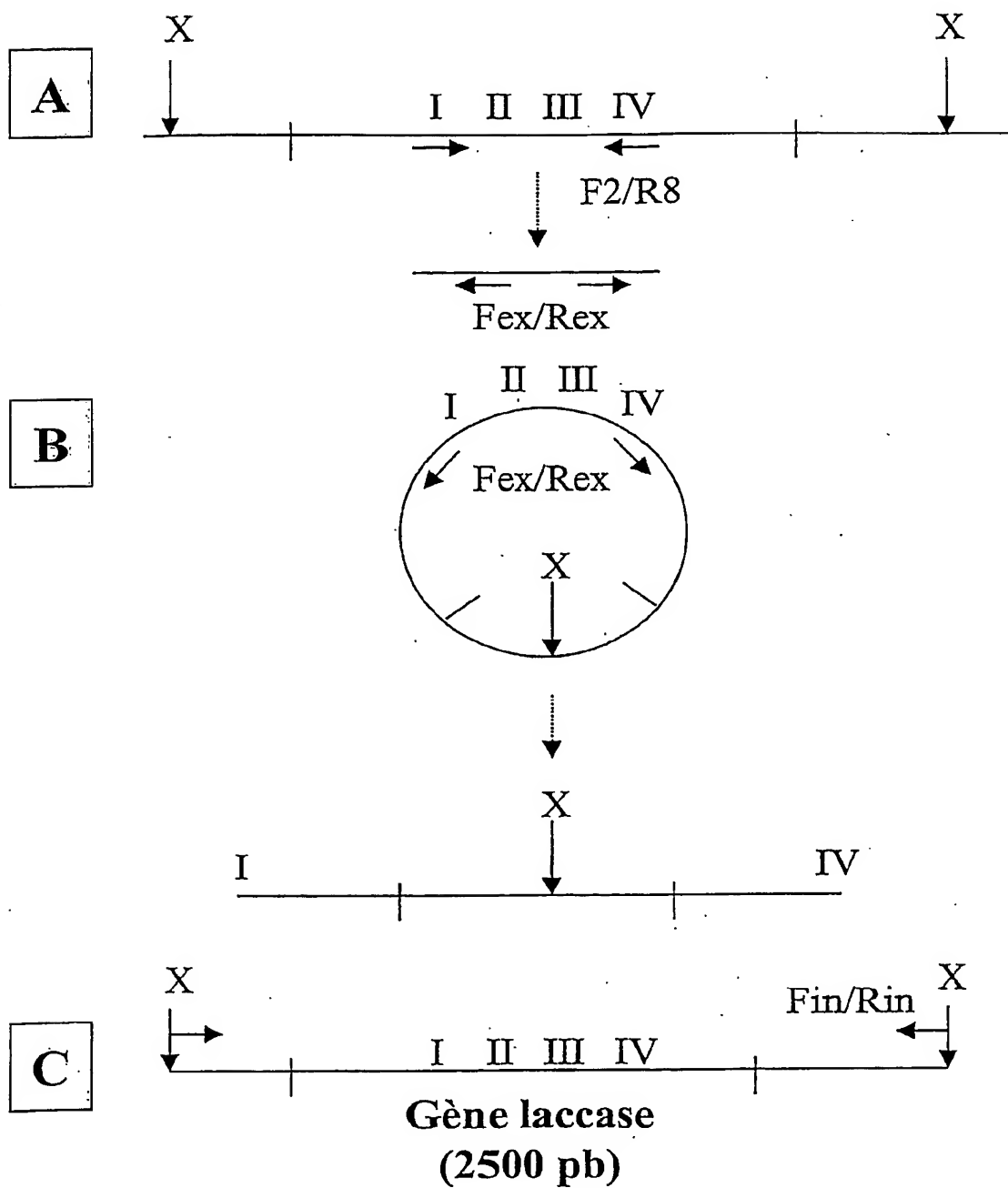


Figure 2 : Isolement du gène codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* laccase

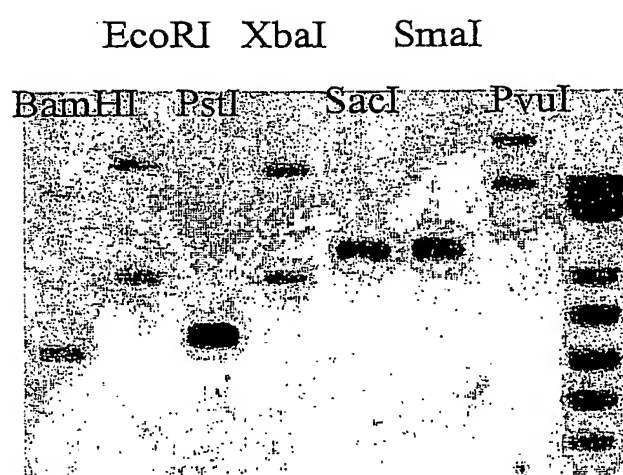


Figure 3 : Etude en Southern blot du gène codant pour la laccase de *Pynoporus cinnabarinus*

CTGCAGACATCTGGAGCGCCTGTCTTTCCCTAGTATBAATGATGTCTGTCCGCGAGTCTTGAAGACCGCTCGAGTCCCACCTTGAGTTTATAGGTAGGAC	100
CTGTCCACCAAAACCCCTCTTCTGATCATGTGAGGTTCAGTCCCTCTTCTTCTGCTCTCTCTCTCCCTCACCCTGTGGCCAAACGACCCATAGGGC	200
M S R F Q S L F F F V L V S L T A V A N A A I G P	25
CTGTGGCGGACCTGACCCCTTACCAATGCCAGGTGAGCCCGATGGCTTCGCTCGCGAGGCGCTGCTGGTGAACGGTATCACCCCTGCCCTCTCATCAC	300
V A D L T L T N A Q V S P D G F A R E A V V V N G I T P A P L I T	58
AGGCAATAAGTatgtatatgtcgtcgtccctcagagctacatacatctgatccacaatcgtttagGGCGATCGATTCCAGCTCAATGTTCATCGACCAG	400
G N K G D R F Q L N V I D Q	72
F2	
TTGCAAAATCATACCATGTTGAAAACATCTAGTATTgtaaggggttcagtttttcccgactaceatgttattgaccatcaccactcgtag CATTGGCACGG	500
L T N H T M L K T S S I H W H G	86
(I)	
CTTCTTCAGCAAGGCACGAACCTGGGCGGATGCCGCGCTTCTGTAACCAAGTGTCCCATCGCTTCGGGCCACTCGTTCTTGTATGACTTTCAAGTTCCC	600
F E Q Q G T N W A D G P A F V N Q C P I A S G H S F L Y D F Q V P	121
(I)	
GACCAAGCAGTcagaattccgtacacgttttcattgctgcgaactaaacctctcttactagGGACTTTCTGGTACCATAGCCATCTCTCCACGCAATA	700
D Q A G T F W Y H S H L S T O Y	137
(II)	
CTGCGATGGTTTGAAGGGGGCCCTTCGTCGCTACGACCCCAACGATCCTCACGCTAGCCTGTATGACATTGATAACGgtgagcagatcatggtatcgcaa	800
C D G L R G P F V V Y D P N D P H A S L Y D I D N D	163
tattgctccacttatgcttctctggcatccagACGACACTGTCAATACGCTGGCTGATTGGTATCACGTTGCTGCCAAGCTCGGACCTCGCTTCCCgtac	900
D T V I T L A D W Y H V A A K L G P R F P	184
gtgtcaaatgtctacgagagatctcacatatacagactagactcacttcgtgattacagATTGGCTCCGATTCACCCCTTATCAATGGACTTGGTCSAA	1000
F G S D S T L I N G L G R T	198
CCACTGGCATAGCACCGTCCGACTTGGCAGTTATCAAGGTCACGCGAGGCAAGCGgtaatgtatggatggctcatcactgcacattggctctgatacatgyc	1100
T G I A P S D L A V I K V T Q G K R	216
ctgtttccacagctTACCCTTCGCTTGGTGTCTCTTCTGCGATCCGAACCATACATTACGATTGATAATCACACAATGACTATAATTGAGGCGGA	1200
Y R F R L V S L S C D P N H T F S I D N H T M T I I E A D	245
CTCGCTAACACTCAACCCCTAGAGGTTGATTCAATCCAGATTTTGCGCGCAGCGCTACTCCTTCGTTGtagg tctgtaggctcctgtcatcaagtttg	1300
S I N T Q P L E V D S I Q I F A A Q R Y S F V	268
cagacattcttagatacaccttttcaatgcagCTGGATGCTAGCCAGCCGGTGGTAACTACTGGATCCGCGCAACCCCTGCCCTCGGAACACAGGTT	1400
L D A S Q P V D N Y W I R A N P A F G N T G F	291
TTGCTGGTGAATCAATCTGCCATCCTGCGTTATGATGGCGCACCCGAGATCGAGCTACGCTGTCCAGACTACTCCTACGAAGCCTCTGAACGAGGT	1500
A G G I N S A I L R Y D G A P E I E P T S V Q T T P T K P L N E V	324
CGACTTGCATCCTCTCTCGCCTATGCTGTGgtacgtgtctcaagaacccctcgatcactaagtgcattgtcaactcatatggtgcatgacagCCTGGCAGC	1600
D L H P L S P M P V P G S	337
CCCGAGCCGAGGTGTGCAAGCCTCTGAACCTTGGTCTTCAACTTCgtgagtaactggcgcgcttccgtagcacacgttcgaacaaagcctgataccat	1700
P E P G G V D K P L N L V F N F	353
gcagAACGGCACCAACTTCTTCATCAACGACACACCTTGTCCGCGCTGTGTCCGACTTGTCTACAAATCCTCAGTGGGGCGCAGGCGGCTCAGGAC	1800
N G T N F F I N D H T F V P P S V P V L L Q I L S G A Q A Q D	385
CTGGTCCCGAGGGCAGCGTGTCTTCTTCCAGCAACTCGTCCATTGAGATATCCTTCCCTGCCACTGCCAATGCCCTGGATTCCCCCATCCGTTCC	1900
L V P E G S V F V L P S N S S I E I S F P A T A N A P G F P H	419
(III)	
ACTTGCACGGTgtacgtctgccttccctcgtctaaaggcgagtcgatctgactcccatcacagCACGCCTTCGCTGTCTCGCGAGCGCC GGGAGC	2000
L H G H A F A V V F S A G S	433
(III)	
AGCGTCTACAACTACGACAACCCGATCTTCCGCGAGCTGTGTAGCACCCGGCCAGCCCGGCGACACGTCACGATTCTGCTTCGAGACCAATAACCCAGGCC	2100
S V Y N Y D N P I F R D V V S T G Q P G D N V T I R F E T N N P G P	467
R8	
CGTGGTTCCTCCACTGCCACATTGACTTCCACCTCGACGAGGCTTTGCTGTAGTATGGCCGAGGACACTCCGGACACCAAGGCCGGAAC CCTGTTCC	2200
W E L H C H I D F H L D A G F A V V M A E D T P D T K A A N P V P	500
(IV)	
TCAGCGTGGTGGGACTTGTGCCCCATCTATGATGCACTTGACCCAGCGACCTCTGAGCGGATTTGTACTGTGACCTGGT GTGGGGGAACATGTGCA	2300
Q A W S D L C P I Y D A L D P S D L	518
GGGCTTTTCATCGATCAGGGACTTTCAAGGTTGGCATAATATACCTACAGGCTGATGACTCGGACAGCGTGTGGGCGTGGGTGTACTCTGCTTGTATGT	2400
TGAAAAAAGGATTTATGTAGAACAATTTATGAGCAATCAGCAATCAATAGGATTTGTGTCGGTTTCGACGAAATGTCTTGTCTCCCTGACATTAATTTTG	2500
TGCGAAGATGGGTCCATGATACACATCATTTGAGCTCTCAATACCAAGAGGATTACCCATGTCAATACCAAGATCATGTCTTCTGCTGTCCGCAATGG	2600
TCTCATGTTGCGTTGAGCAGATCGCAGTACGTTGAAAGCGATTAGTAT TACATGCAACATGCAACATTTGGAAGGGGSCATGACAGGTTTCAGCTCGCG	2700
TCAGTCGGCCAGTAGCGACCTTTGCGGACCTGCTGTAACTGAACGTATGCTTCAGAACTCCGTCGGTATCGAGAGCGATCGTGTACGTTCCGGGAT	2800
AGATCCATTGATCCCCGCTCTGGTGGGCGGTCGATGGCCCGGAGCGTCACCGGACGTTTCGCGATCGCGCTTTTCTAGGGGCGAGGCGGTGTACCCG	2900
CGTGTACGAGACGAGCTGCTTGTTCGGGTGGGGCGAAGGCCGGAAGGAGCCACTCACGAAGAGCAATGCGACGTAATCCGAGGTAGCCTTGCCCGTGTTA	3000
GTCACACGCACGGAGAACGTGTCTGAGCGGCGC GAGGTCAGGAAGGCGGCGCTCTTCTGACCGCGCTGTACGAGGTCGGAAATCGAATACGTCGATGGCG	3100
GTCTCCAAAGTCCGTGACGTTGGTTCGATCGGCGCGCGGCTGGAGCTGCCAAGAGAAATCGAAGGTGGTGAAGTGCAGTCCAAGGCCAAATTCGTA	3200
GACCGGCTGCGCGGTGTACCACTTGTATGTACGCCCCGGGTCGACGCGCTTGGGCGAAGGCT CATGTGAGTCATCGGAACCTGATCAGCGTATAGTGGCT	3300
GGGTATTGGGTGATGGGCAGGCGTCTGCGAG	3331

Figure 4 : Séquence du gène codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus*

AGATCTCCGAACCAGAAATGCGATTGCGTTTCAGGCCCAATTAAGAATAAAGCTGCGTCAGGGCAGCGACGTA
 TCTTGATCCATCATTGACTCACCGGCATCGGCGTCAACACCAAAGCAAGCTCGTCCCACCCATAGGCGTGCA
 CCGGCCGCGTGCGCCATTGAGGTACATGAGCGGGGCGAAAGTCCGCCATTGGTAGCCCTGTCTGTGGACGCG
 CGGCGATGAAACGTTTCCCACCATTGGGAAGAAACGTCTGCGGCCCATCATCCCTTCACCGGATGACAAGGC
 GCGTTCGCGCCTTTGCCGCAGAGGCCGCGGGCGACATGCACAGCGAAGGTCCGTTGCGGGATGGGAAGCAGG
 CAATCAGTGGGTGTCTACGCCGCCACGATGGTTCGGGGAGCGTAGGCGCCCTCCCATAAGGCGGCAAGCATC
 ATGATGCTCTCCGATTCCGGGAAGCCTGGTGCATGCTGGAGAGACTCTCTCCGAGAGACCAGTGTGCGCAAC
 GTTCCTGGCCTGGAAGACTTTAAAGTGAGTGTAAGGGCGAGCAGAGGACGATCATCGGATTGCAGGAACC
 ATCGGCATCCTCAGCCTGGGAAGGATGGTCTTGGTAGACATTGCGCGGAAGGTGTCCTAGATGTGAGCGGGC
 TTCTTGGATGATCATGTCGTAACTTTTTCTGACCTCGTTCGGTGGTACGCATGGCAGGATTGAGCATTACGGT
 ATGCCCTCCCATTCATAAACGATAACCCCTTCCTTCAGGTTGGTCATCTCCATAGAGCGGCACGCTCTCAAGG
 CCTAGGCTATTACACCTCCTTCGCAACATCCCTATTACGGTGTCTGTAAGGAACGACTTGTCTATGGGATC
 ACATGAAGTGCAGCATACTGTTCCGCGGTCTCGCAGTACAGACGCTAGTACGGGAAGTCGACATCCAAGCGT
 TCAGTCACCACATGGCAAAAAAGCTGCACCATACTCTTTATGGTGAGTTGTTTCGTGAGTGGTATACAGTCAT
 TCATGAGGGAATGCCACCGGATAGGGTGTGGCGGCCGCAATATTCATCGCCTGGCAATAGTCGATGTGCGT
 CTTTGTCAATGAATATCATGGGTACATGTGGGAGACGGTTAAACAGCGTTGACTGTGAATCCCTGGTGTGT
 GTTGGGCCGAACAGGTACGTTGCAGGAACACCAATATCTCTTCGGCAGCCAGTTCTTTGCGAGCGGCACAG
 GCAGGCATCGCGCAACAGATCCCAGCCATCCGGCCTCTGAATTTCGGGATACCTGAAGCCCTTCAGGTACGG
 AGCGAAGAGGTGGGCTCTCTGCAGCGATTGGCGGACGGATAGCTGTATTTCTCTCTCACCATTGGGAAGAT
 GTGAAAGGCTCCATCATATAGCGGCTCAACTCTACCTCGAATGTCCAAACACGGCGGGAATACTTATTTATG
 TGGACAAGGCCGAGCTATGATAGCTTGCTCCCGAAGTTGGTAAGTCCCGCAATCTGCGGTTTCAGGCAACAGT
 CTCGGAAAAATAAGAAGAATATTGTAGGTGCGTGTAGGCGTATCGCCCAAATGCGCACACACGGAGGCTTTA
 GGAGATGAAGCGCCCGTGAGCGGTAAGGGAGTTGGTTCACCGCCGCCCCGACCGACTCTCTCTCTTTCCCAG
 CATCATGTCTCGGCGCAAACTTTACCCTCTATTGACCAACTCCACGAGAAAGCAGGAACAGCTTCCTTGTCT
 CTCATGACGTCCGCAATCCAGACCTTAGCCGGTTGCTTACTCATCGTTATCCCTGCCGCCATGGTAGTGGA
 GTCAGCCTGGCCAGTGCCTAGTCCCCTCTCTCTTGCTGCACTAGAGAAGCCCCATGAGACAGCGTTTTTTTGC
 TTTATTTCTGCTGTTTCTATAGACACCATAGGGGGCAAACGATCCTGCACGCCCAGAGGTATTGGGCTCGTCA
 GATTCACGATTTTTCTCCTCGGTCTGAATCGGCTGCACGGCAGATAAATCGGCCGGAATGCTATAGCCCTT
 CATAGCCCGCTATGAGAGTCGCAAAAGGCTTGTCAGTCAGGTCGGTCGAGTGGCTCTCACGAAGAGCGTCAA
 CTTTCGCGGACAGCCGCTTTTCAGGGCAAGATAGATCCTCCCATCATCCCTACTGCGCTCAGCGCCGGTAC
 CGAACAAATTGACTTACCGACATCCTCCGGGACGCGCAAATGCTGTTTCGACGGAACGTAATCCTCTTCGTCCC
 GCCTCTTTTCGCTCTCACGCATTCCGTGTGGTTTCGCGGACGGCCGCTCATCAGGACCAGACCAGTCTCAAT
 GTCTGGTACCGGCACAATGGTGACACTGCGGCAACTGAGTAGGTCTGGTCACTCTGGTGCACCGTCTGCTTAC
 GCTGACCTTCGGGATACTGTCTGACAGACATCTGGAGCGCCTGTCTTTCCCTAGTATAAATGATGTCTGTC
 CGCAGGTCCCTGAAGACCGCTCGAGTCCCACTTGAGTTTTAGGTAGGACCTGTCCACCAAACCCCTCTTTCT
 GATCATG

Figure 5 : Séquence de la séquence promotrice du gène codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* (jusqu'à l'ATG codant pour la méthionine de la laccase)

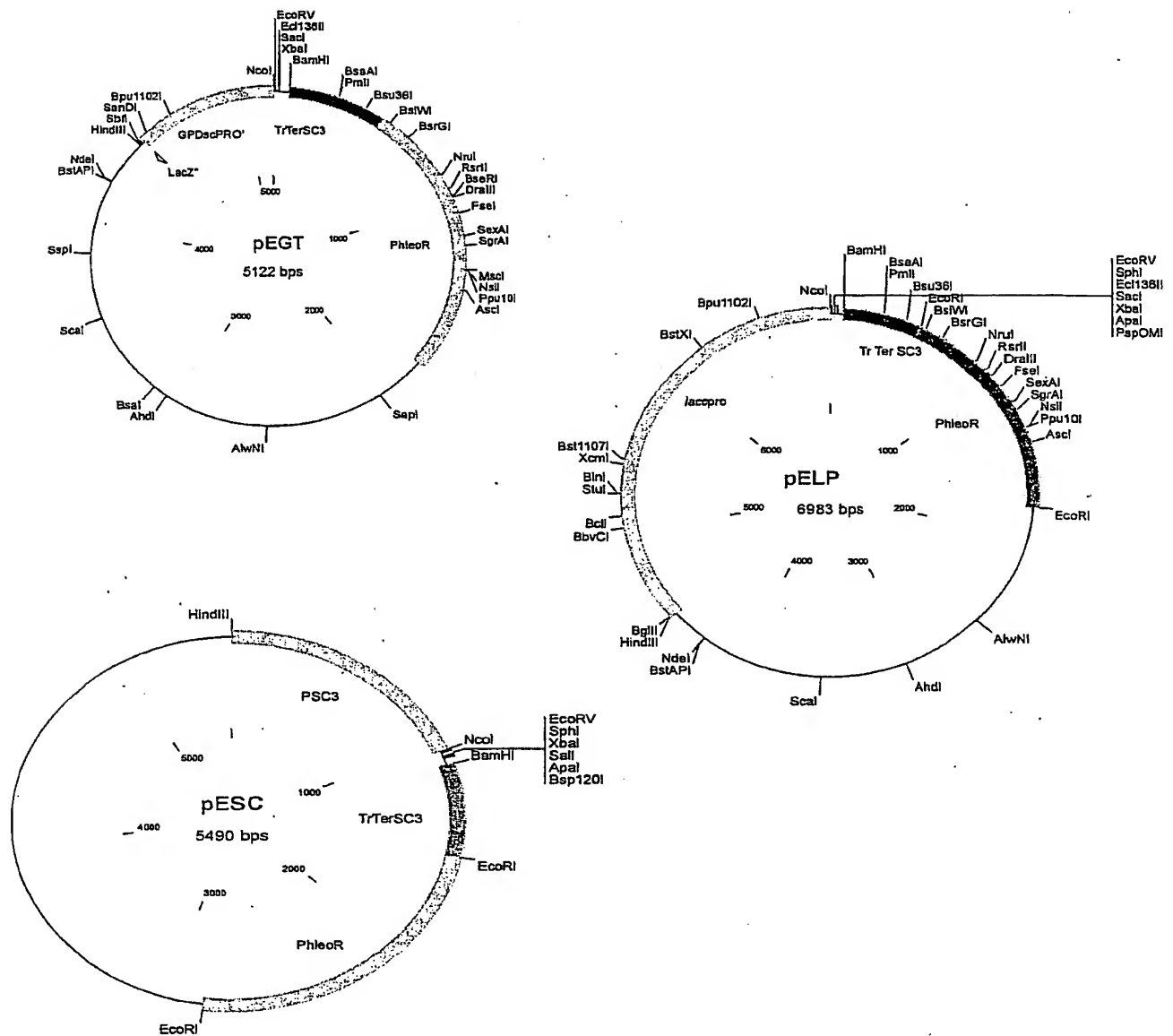


Figure 6 : Carte physique des trois vecteurs d'expression utilisés pour la production de la laccase chez *Pycnoporus cinnabarinus*

CATGGGATATCGCATGCCTGCAGAGCTCTAGAGTCGACGGGCGCGGTACCGGGCGCGCTTAAGACGCGTGGATCCGCAGGTGAAC
 GCGCCTATCGGTGGGATATTGGGCGACGGGAGCCTCGGCAATCTGAGCCTCGTACTGCCTAGCAAAATTCGGAATCCCTTCGATGT
 CATAGGGTCGCGGACAAGTGATCGTCTTGCTACATACTCCAAGGTGTTGACTCATTCCTCGATAATGAACATTTGTTGTTGTTGTTG
 TTCTCTATCCGCTCAGTCACGCGACCCACACGTGCATGGTTGAACCTTCGCCACGCAACAACCGCATGACGACATGCGCAACCTAAG
 TAAAGGCTGAGTCGTGGACTAAAGCACTCCACTTTACGGCGAGGATGCCAGTCTACGTCAATGAAGCCTCAGGTCCCGAAGTAA
 GGGGGTACAAAAGGAGGGGTGAAAGGTGGACGTTTTCTTACCATCCTTCCACCTCCAGACCACATGCCGGGAATTCACAGCTTGCT
 CAAAAGGTTCTGCCGTACGCCCGGAAAATTCCTTCGAGGTGGGCCCTATCGCATACATGCACGACTTCAAAACAATCCATTCTATC
 ATTTTGGGATCGTACAATTATTAGACATGTTGTACAACGTTACATTCCTTTCTTCTTTACTCTCCGCGCCAGTCTATGTAGAGGTAAA
 GTACAAGCGTCCAAAGGATCAGGCACCTAGAGCGCGCGCTTGTCTCGCCGCTTAGAGCGCGCGCTGCTGCTTCGCCGCTAGACG
 AGCAGGTCGCAGACACGGCGGGAGTAGCCCCACTCGTTGTCGTACCAGGCAATGAGCTTCACGAAGCTTGTGTATCGCATGCCG
 GGGATCGATCCAGCGCTTAAGGGCGCGCGGTACCCCTCGGACCCGTCGGGCGCGTCCGACCGCGGTGTTGGTCGGCGTCGG
 TCAGTCCTGCTCCTCGGCCACGAAGTGCACGCAGTTGCCGGCGGGTGCAGGCGAAGTCCCGCCCCACGGCTGCTCGCCGAT
 CTCGGTATGGCCGGCGGAGGCGTCCCGGAAGTTGCTGGACACGACCTCCGACCACTCGGCGTACAGCTCGTCCAGGCGCGCAC
 CCACACCCAGGCCAGGTTGTTCGGCACCACTGGTCTGACCGCGTGAACAGGGTACGTCGTCGCCGACCCACACCGCG
 GAAGTCGTCTCCACGAAGTCCCGGAGAACCCGAGCGGTCGGTCCAGAACTCGACCGCTCCGGCGACGTCGCGCGCGGTGAGCA
 CCGGAACGGCACTGGTCAACTTGGCCATGCATGGTGATGGGCATTATGTGTGATGGGATGCGATGGGAGAGGGAAAGTCTCTGGATG
 GGAGTGTGGAGAAAGAGGGAGACGGCGGGCGCGCGCTTTATACCCAGCCCGAAAGATCCGATCGATACTGACAAAACGGGA
 TGAACACATCCGGCGCGCGCTGGACTGCGCGCAATCTGCAATGACCGAGCCAGTCCCGTCCGGCGCCACCAACCGCGTCCG
 CCCCCTCGAGGGCGACGCTCTATTCTATCCATGCGCGCAATTGCAGGTGCGCGGTGGAAGAACAGTCTTCGAGTCTCTCTCGCAC
 TGGGCTGCGACCTGTCTACCTCTCATCTTAACCCCTCCGCGGCTTCGACAGTACTAATCTCACACCGAAGAGGCTCTCGCG
 CACCCTCCGATCCCGAGCAGTTCTTACATGCCACAGCGTCAGAAATTGAACACAATGCACGTCARATCAGATCCCGGGAATTCGT
 AATCATGTCATAGCTGTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTACAAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAG
 CCTGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCT
 GCATTAATGAATCCGGCAACCGCGGGGAGAGGCGGTTTGGCTATTGGGCGCTTTCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCG
 GTCGTTCCGCTGCGCGAGCGGTATCAGCTCACTCACTGCGCAATGACCGTATCCACAGAATCAGGGGCAATACGCAAGAAAGAA
 CATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTGTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACG
 AGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAAGCGTTTCCCTCGGAAGCTCC
 CTCGTGCGCTCTCTGTTCCGACCTGCCGCTTACCGGTAACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTC
 ACGCTGTAGGTATCTCAGTTTCGTTGAGTTCGTTCCGCTCAAGTACCGGTGTTGTCACGAACCCCGTTACGCCGACCGCTGCGC
 TTATCCGGTAACCTATCGTCTTGAAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGA
 GCGAGGTATGTAGGCGGTGTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCT
 CTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTATGCTTACCGTAAAGTACCGGCAAAACCAACCGCTGTTAGCGGTGTTTTT
 CTAAGCAGGATTAACCTTCGGCAGAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAA
 AACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTAACAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAA
 TCTAAAGTATATAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTT
 ATCCATGTTGCTGACTCCCGCTCGTGTAGATTAACAGTACCGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCG
 AGACCCACGCTACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATC
 CGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTATGTCGCCAGTTAATAGTTTGGCGAACGTTGTTGCCATTGCT
 ACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTTGGTATGGCTTCACTCAGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTATCACTCATGGTTATGGC
 TGTGTGCAAAAAAGCGGTAGCTCTCCGTTCCGTAAGTGTGAGAGTAAGTGGCGCAGTGTATCACTCATGGTTATGGC
 AGCACTGCATAATTCTTACTGTCTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTACTCAACCAAGTCTTCTGAGAATAG
 TGTATGCGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCATAGCAGAACTTTAAAGTGTGCTCATATT
 GGAACACGTTCTTCGGGCGGAAACTCTCAAGGATCTTACCGTGTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTGTCACCCCACTGA
 TCTTCAGCATCTTTACTTTACACGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGAC
 ACGGAATGTTGAATACTCATCTCTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATGTCTCATGAGCGGATACATATTG
 AATGTATTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTCCCGCAAAAGTGGCACTGACGTCTAAGAAACCATATTATCA
 TGACATTAACCTATAAAATAGCGGTATCACAGAGCCCTTTCGCTCGCGCTTTTCGGTGTGACGGTGAAGAACCTTGACACATGC
 AGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGG
 TGTCCGGGCTGGCTTAATATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTA
 AGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCCATTGCCATTGAGGCTGCGCACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGCTCTTCGTTATTA
 CGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAAACGCCAGGGTTTTCCAGTACGACGTTGTAAACGAC
 GGCCAGTGCCAAGCTTGATGCTGCAGGTGACGACCGAGCGCGGCCACCCAGCCTATCCCGCGCGGGTCCGGACCCAAAAATAA
 GCGGGCCCCCGCGCGCCCGTCCGGCGAGCGGGTGTATCTACGAACGGAAGTGGGAGGCGACTCGGAAGAGTTTGGTTAGAAAGGG
 GAACACCATCGCGGACGCCAGTGTCTGGDCAGCTGAGCGTGCAATTGTGTTCAATTCTGACCTGTGGCATGTAAAGGAACGTGCTC
 GGGATCGGAGGGTGGCGGAGAGCCTCTTCGGTGTGAGATTAGTAAGTGTACTGCGAAGCCGCGGAGGGGTTAGGATGAGAGGTAG
 ACAGGGTCGACGCCAGGTGCGAGAAGGACTGCGAAGGACTGTTCTTCGACCGCGCACCTGCAATTGCGCGCATGATAGAAATAGA
 CGCTCGCCCTCGAGGGGAGTCTGACAGGGCTGGTGGCGCCGACGGGACTGGCTGGGCAATTGTCAGATGGCGCGCAGTCCAG
 GCCCGCGCATGTGTTTCATCCCGTTTGTTCAGTATCGATCGGATCTTCGGGCGTGGGTATAAAGCGCGCGCGCTTCCTCCCT
 CTTTCTCCAGCACTCCCATCCAGAGCACTTCCCTCTCCCATCGCATCCCATCACACAATAATGCCCATCAC

Figure 7 : Séquence nucléotidique du vecteur pEGT, contenant le promoteur du gène *gpd* (4480-5122), un marqueur de résistance à la phléomycine (507-1822) et le terminateur du gène *sc3* (71-507).

CAGCGAAGGTCCGTTGCGGATGGGAAGCAGGCAATCAGTGGGTGTCCTACGCCGCCACGATGGTTCGGGGAGCGTAGGGCCCTCCCA
TAAGGCGGCAAGCATCATGATGCTCTCCGATTTCGGGAAGCCTGGTGCGATGCTGGAGAGACTCTCTCCGAGAGACCAAGTGTGCGCAAC
GTTCTTGGCCTGGAAGACTTTAAAGTGAGTGTAGAAGGGCGAGCAGAGGACGATCATCGGATTGCAGGAACCATCGGCATCCTCAGC
CTGGGAAGGATGGCTCTTGGTAGACATTTCGCGGAAGGTGTCCTAGATGTTGAGCGGGCTTCTTGGATGATCATGTCTGTAACCTTTTCTGA
CCTCGTCCGTTGGTACGCATGGCAGGATTGAGCATTACGGTATGCCTCCCATTCATAAACGATAACCCCTTCCTTCAGGTTGGTCATCTC
CATAGAGCGGCGACGCTCTCAAGGCCTAGGCTATTCCACACCTCCTTCGCAACATCCCTATTACGGTGTCTGTAAGGAACGACTTGTCTAT
GGGATCACATGAAGTGCAGCATACTGTTTCGCCGGTCTCGCAGTACAGACGCTAGTACGGGAAGTCGACATCCAAGCGTTTCAGTACCA
CATGGCAAAAAAGCTGCACCATACTCTTTATGGTGAGTTGTTCTGTGAGTGGTATACAGTCATTTCATGAGGGAATGCCACCGGATAGG
GTGTGGCGGCGCAATATTCATCGCCTGGCAATAGTCGATGTGCGTCCTTGTTCATGAATATCATGGGTCACATGTGGAGACGGTTAA
ACAGCGTTGACTGTGAATCCCTGGTGTGTGTGGGCGCAACAGGTACGTTGCAGGAACACCAATATCTCTTCGGCAGCCAGTTCTTTG
CGAGCGGCACAGGCAGGCATCGCGCAACAGATCCCGAGCCATCCGGCCTCTGACATTTCGGGATACCTGAAGCCCTTCAGGTACGGAGC
GAAGAGGTGGGCTCTCTGCAGCGATTGGCGGACGGATAGCTGTATTTCTCTCTCACCATTGGGAAGATGTGAAAGGCTCCATCATAT
AGCGGCTCAACTCTACCTCGAATGTCCAAACACGGCGGGAATACTTATTTATGTGGACAAGGCCGAGCTATGATAGCTTGTCTCCGAA
GTTGGTAAAGTCCCGCAATCTGCGGTTTCAGGCAACAGTCTCGGAAAAATAAGAAGAATATTGTAGGTGCGTGTAGGCGTATCGCCAAA
TGCGCACACACGGAGGCTTTAGGAGATGAAGCGCCCCGTGAGCGGTAAGGGAGTTGGTTACCCGCCGCCGCCAGCAGCTCTCTCTTT
CCCAGCATCATGTCTCGGCGCAAACTTTACCCTCTATTGACCAACTCCACGAGAAAGCAGGAACAGTTCCCTGTCTCTCATGACGTCC
GCAATCCAGACCCCTTAGCCGGTTCGTTACTCATCGTTATCCCTGCCGCCATCGTAGTGGAGTACGCTGGCCAGTCCGTAGTCCCGTCT
CTCTTGCTGCACTAGAGAAGCCCCATGAGACAGCGTTTTTGTCTTATTTCTGTGTTTTCTATAGACACCATAGGGGCAAACGATCCTG
CACGCCAGAGGTATTGGGCTCGTCAGATTCCAGTTTTTCTCTCGGTCTGAATCGGCTGCACGGCAGATAAAATCGGCCGAAATGCT
ATAGCCCTTCATAGCCCGCTATGAGAGTCGCAAAAGGCTTGTCAAGTCAGGTCGGTCGAGTGGCTCTCACGAAGAGCGTCAACTTCGCG
CGACAGCCGCTTTTCAGGGCAAGATAGATCCTCCCATCATCCCTACTGCGCTCAGCGCCGGTACCGAACAATTGACTTACCGACATC
CTCCGGGACGCGCAAAATGCTGTTTCGACGGAACGTAATCCTCTTCGTCGCCGCTCTTTTCGCTCTCACGCAATTCGTTGGTTCGCGCGA
CGGCCGCTCATCAGGACCAGACAGTCTCAATGTCTGGTACCGGCACAATGGTGACACTGCGGCAACTGAGTAGGTCTGGTCACTCTG
GTGCAACGTCGCTTACGCTGACCTTCGGGATACTGTCTGCAGACATCTGGAGCGCCTGTCTTCCCTAGTATAAATGATGTCTGTCC
GCAGGTCTTGAAGACCGCTCGAGTCCCACTTGAGTTTTAGTAGGACCTGTTCTCCACAACCCCTCTTTC

**Figure 9 : Séquence nucléotidique du vecteur pELP (suite),
contenant le promoteur du gène laccase (4457-6983), un
marqueur de résistance à la phléomycine (507-1822) et le
terminateur du gène sc3 (71-507)**

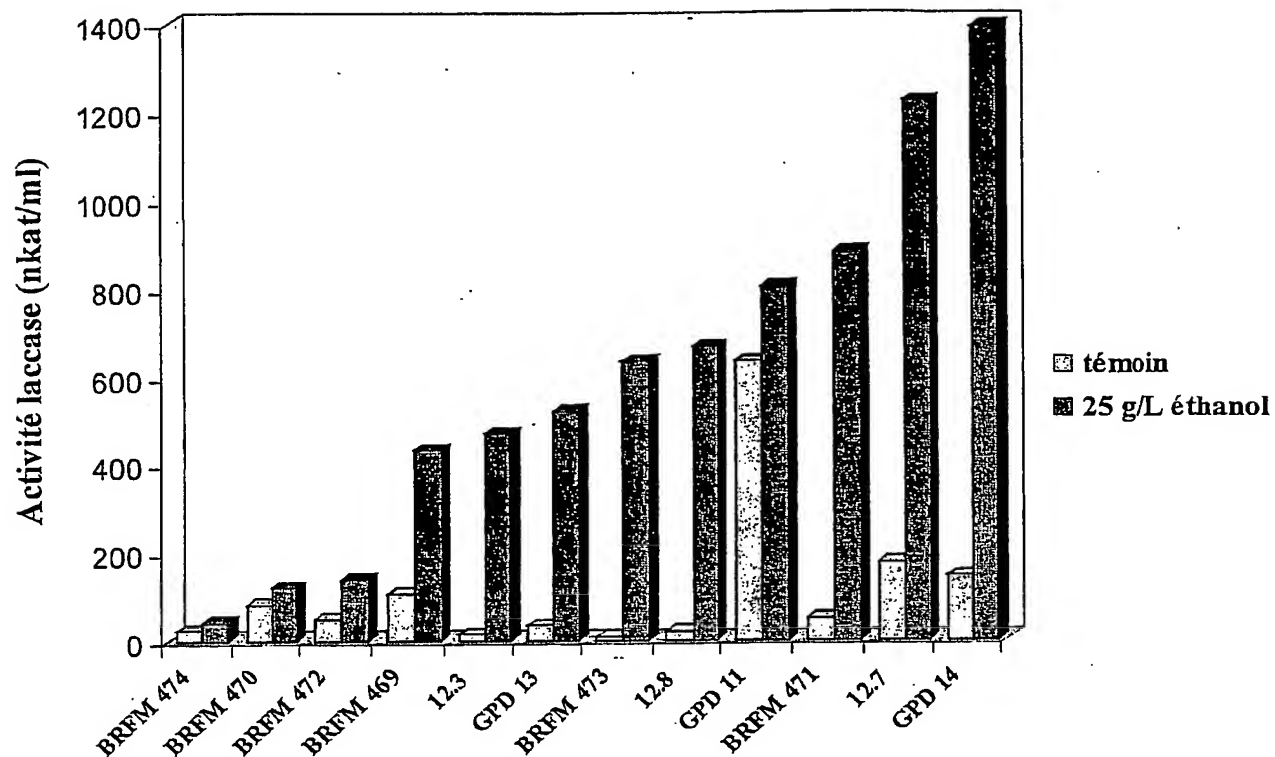


Figure 10 : Résultats de production des transformants présentant les activités les plus importantes. La culture a été effectuée avec ou sans (témoin) éthanol

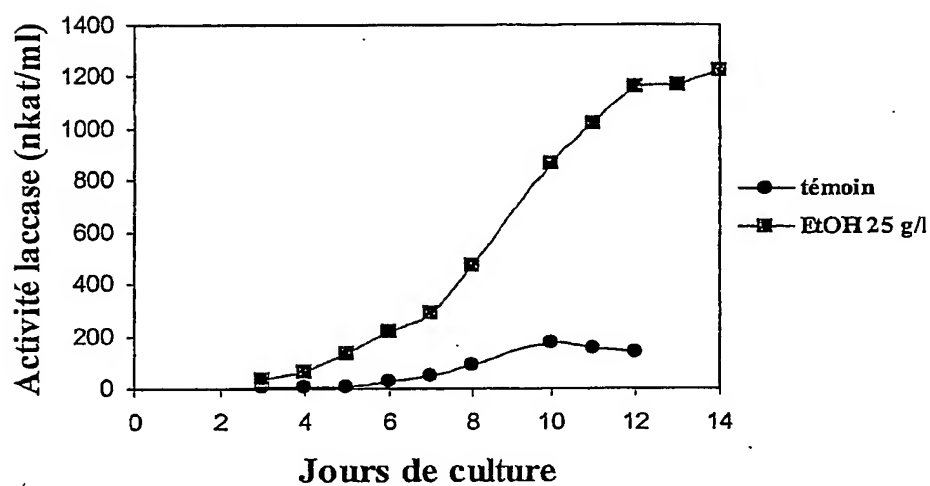
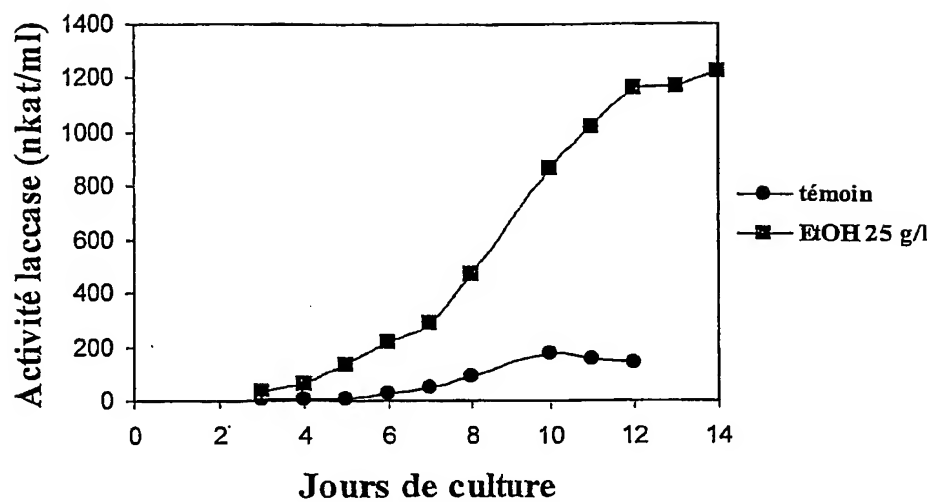


Figure 11 : Suivi des activités laccase des transformants GPD 14 et 12.7 en fonction du temps avec ou (témoin) sans éthanol

TGGGGAGATGGTCTATATATCAAAATGATCTTCTGCTCTGAGCTTTCCTCGTCTTGTGTTTCTGTCTTGTGAGTCCGCGACATGCTTTTATTAAACCAT 100
TGGCGAGCTGCCCGCGCCCAAGGAGATAGCATATCGCCTGAGAAACCTAGTCTGCTCATGGCGGTGTAAACGTTCTTGGGACTTATTTCGCACTTCTC 200
TCGAATATATAAGGCGCTATTGTGATACGGTTCATCTAACCCCGAGCTCCCTCCGAAAGATGGGCTGCCCTCTCACTCTCGCATTCCTTACTGCTTTAAA 300
CTCAGTTCATGCGGCTGTGGGTCCCGTTACGGACTTAACACTGATCGTAGATCTGTCGCCCGGAGCGGTGCTGCTTTCGCGCGGGAAAGTGGAGACTTTG 400
SVBAAVGPTVTDLTLLIVDTVAAPDGAFAFAR 43
CGACTGTAATGCCGGATTGAGTTTCTAATTATATCTTCCAGCCATTGTCGTCCAAGAGGAACCAAACTCCGTCATTGGTCCGGTCATCGTAGGTGGG 500
TAGCTACGAGTCTTCTCTCTTCAATTTAGCTCATCACCAGTGTATGATATTAATTAAGGTCAAPAGGGGGACACTTTCGGCTCAATGTTATCAACAT 600
TTGGAITCTCCGAACATGCGCAATCTACTTCCATTTCATGGCATGGCATCTTCCAAGGAAACGGTACGTGGTATATCGGATAATCTATCTGTATCCATT 700
LDSPNMRQSTSIHWHGIFQGN 95
GACTCGAATATAGTCAAGATTGGGCTGGTGGCTTCTGAAGCTGCTCGAATTATCTTCTCTGAATTTTATGATGGCGCGCATTCGTTAAC 800
AGGTAAAGAGATGTTCTGCTTCTTCCCCAGAACTAATTAATCTAGTCCCATTCGCCCGGAGGGGAGTCCGTTCTGTACGACTTACCGAACCT 900
TTCAGACTGGCACATTTGGTATCATTCCTATTTCAACTCAATACGCGATGGAGTGGAGGAGCATTCGTCGTTCTCTCTCTCATCAAGTCA 1000
FQTEGTFNTHSHSLSTQYCDGLRGAFV 150
CCGCTTCTTCTCACTTATCTAGATCTACGATCGCTCGACCTTACCGGTGCTCTACGATGTCGACGACGAGTCTGATGTGATTACTCTGGCGGACTG 1100
GTACCAAGCTATGCGGAGGACATTTCTAATCGCTAGGAGATTTCCTCCAGATGTCTCTCTGCTCTGAAATCCATGAACTAGTGAGGCGACACTA 1200
YHSYAEEDILIA 191
TCTCTCATCAATGGTACGGAAGATTCCGCGGAGCGCGGGAACGGCAACAGAACTATCTGTCACTACTGTTGAGCATGGAAGCGGTAGGCATTCCTCT 1300
ILINGHGRFAGGTAATELSVITVEHGR 220
CGGCTTGTAGATGTGTCTAATTGTGATAGCTACCGATTGCGATTGCGCAATATCGCTTGTGACCTTGGTTTGGCGTGAAATCGATASCHTACGAA 1400
CCTTCGCTTATCGAGCTGACGGTATTACTACTGTGCTGTCACGGTGGACTCCTTCAATGTAGGCTTACCTTAGCACTTTCCTCACTCTGGATCCTCT 1500
LRLVLEADGIT 254
TATGACTTCCCAAGTCTTGTGGGCCAACGATATAGTGTCTCTCCATGCCAACCGCTGTTGGAACTACTGTAAAGTGCCTAAATGTTGCTATGAC 1600
TGTCCATGATTCTAACCCCGCCAGGATTCGGGCGCTCCGAAACGGCGTGAGCAATTCGCGGTGGGATCGACTCGGCTATTCTCCGTTATGTTGGCGC 1700
WIRAAPNGVSNFAAGGIDSAILRYVGA 300
CCCAGAGAAGAGCCCAACTACTGTGAGGATCTCCATCCGACACTTCAAGAGCAGGATCTTCAACCGCTGATCTACCCGCGCGCCAGGCATCCAC 1800
PEEPNTSEDTPTSDTLQEQDLHPLILPLGAPGIH 333
TCCCGTGGGCGCGCGACTTGTCCACACCGTATCAATGGAGTTTCTGAGTGTGGGCACTTTTCTGGCCCTTTATTAATATATCTGGTAGGATGTC 1900
SRGAADVHTVSMEEF 348
GCAAACTTCCAATTCCTCTGGATGGCGTGGCTTCCAGCCGTGCTCATCTCTTCAAGAAATTTATCTAGCTGACGATTTTGAATGTAGCCCGACCA 2000
LTIILKCSPT 357
TGCCTGCTCTTCTGCAATATTATCGGGAGCGAGACTGCTAATACCTTCTCCCGCGGGATCCTTTATCCAGCGTCCGCAATGACATCGTGGAGCT 2100
MPVLLQLSLSGAQNTALLPAGSEFIQASHNDIVEEL 391
CAATTTCCAGCTGTCAACGTAGCCGTGTGGTGGACCGTGGCTCCCATCTTCTTGGCAGCTTGAAATTTACGCTCTTTAGACATCCATCCATCT 2200
NFPAPVNVAAVGGF 409
GTGAGCGAGCGGACCTTTGGCTTATGGCATATGACTTATTATTAGCCTGGCCATGCTTCGACGTATACGCTCTGCTGGAAACGAACTCCGATACT 2300
HGHAFDVIIRSAAGTNSDN 426
GGTTCATCCGCTATTTTCTTTCGACTTCCATAAGATGACGATGGCTCACTATGGTTTTTACCAGCCTCGCAGAGATGTCGTATCCACCGGTACCGATC 2400
WFPNPT 441
CTAATGACATGTGTACGTGTTTCGCTATTGATGTCCGTTTTGATTTGACTGTTGGAACGACCATTCGCTTCCGGSCGACAAACCGTACGTAACCTG 2500
PNDNV 455
CTGAATCTCTGCTGTCTTGGTTCTCATATCTCATCAGAGGTCCATGGTTCCTTCACTGCCACATTGACTGGCACCTTGAACTCGGCTTTGCTTTGGT 2600
G 2700
GATTGCAAGCGCCTAGCGAATGGGACAGGACATTAACCTCTGCTGGCTGCTGTGAACCTTTCTCCCTACACTGCTAAGATCGCTCTAGCTG 2700
IAEAPSEWDSDINFP 491
CGTGGGATGACCTATGCCCTACGTTCCGTTGGCTTCTCTTTACTATTTCAGTTTCTCACTTCTCACTTCAAGATATGATGCCCTGCCGCTGAG 2800
AWDDLCPTFAWLLFYFYFKFPHILNFTDMMPCLRLS 525
CAGCAGTAATCGAGTTAAAGACCTCAACGTTGCTAAGGAAAGCAAGCAGAAATGAACTCTCATTTATCTTATATCGACACATTCATATTCAA 2900
SSNRVKNLNV 536
CCTACGGATTTTCTCTCGACCTGAATTCGGTGTAGATCCCATCTTGGTGGATAGGAAAGAAATTTCTTGTATAAACCATGGGTTCTTCTACC 3000
ANTATATCATAGCTCCGTGGGTTAGTTAATGCT 3037

Gène de la laccase d'*Halocyphina villosa*

Figure 12

- 1 -

LISTE DE SEQUENCES

<110> INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

<120> PROCEDE DE SURPRODUCTION D'UNE PROTEINE DETERMINEE PAR DES SOUCHES MONOCARYOTIQUES DE P. CINNABARINUS

<130> WOB 03 DH INR ORUS

<160> 16

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 3331

<212> ADN

<213> Pycnoporus cinnabarinus

<400> 1

```

ctgcagacat ctggagcgcc tgtctttccc ctagtataaaa tgatgtctgt ccgcaggtcc      60
ttgaagaccg ctcgagttccc acttgagttt taggtaggac ctgtccacca aaccctctct      120
tctgatcatg tcgaggttcc agtccctctt cttcttcgtc ctgctctccc tcaccgtgt      180
ggccaacgca gccatagggc ctgtggcgga cctgaccctt accaatgccc aggtcagccc      240
cgatggcttc gctcgcgagg ccgtcgtggt gaacgggtatc acccctgccc ctctcatcac      300
aggcaataag gtatgtatat gctgctcgtc cctcagagct acatacatct gatccacaat      360
cgtttagggc gatcgattcc agctcaatgt catcgaccag ttgacaaatc ataccatgtt      420
gaaaacatct agtattgtaa gggttcagtt tttcccgcact accatgttat tgaccatcac      480
cactcgtagc attggcacgg cttcttccag caaggcacga actgggcccga tgggtcccgcg      540
ttcgtgaacc agtgtcccat cgcttcgggc cactcgttct tgtatgactt tcaagttccc      600
gaccaagcag gtacgaattc cgtacacgtt tcattgcgtc gcaactaaac ctctcttac      660
tagggacttt ctggtaccat agccatctct ccacgcaata ctgcgatggt ttgagggggc      720
ctttcgtcgt ctacgacccc aacgatcctc acgctagcct gtatgacatt gataacggtg      780
agcagatcat ggtatcgcaa tattgcgtcc acttatgctt cctggcatcc agacgacact      840
gtcattacgc tggctgattg gtatcacgtt gctgccaaag tcggacctcg cttcccgtac      900
gtgtcaaatg tctacgagag atctcacata tacgactaga ctcacttcgc tgattacaga      960
tttggctccg attcaaccct tatcaatgga cttggtcgaa ccactggcat agcaccgtcc     1020
gacttggcag ttatcaaggt cacgcagggc aagcggtgaa tatggatggt catcactgca     1080
cattggctct gatacatggc cttgtttcca cagctaccgc ttccgcttgg tgcgctttc     1140
ttgcgatccg aaccatacat tcagcattga taatcacaca atgactataa ttgaggcgga     1200
ctcgatcaac actcaacccc tagaggttga ttcaatccag atttttgccg cgcagcgcta     1260
ctccttcgtg gtaggtcgta ggctcctgtc atcaagtttg cagacattct tagatacacc     1320
tttttcaatg cagctggatg ctagccagcc ggtggataac tactggatcc gcgcaaacc     1380

```

- 2 -

tgccttcgga aacacagggtt ttgctggtgg aatcaattct gccatcctgc gttatgatgg	1440
cgcacccgag atcgagccta cgtctgtcca gactactcct acgaagcctc tgaacgaggt	1500
cgacttgcat cctctctcgc ctatgcctgt ggtacgtgtc tcaaagaacc tcgatcacta	1560
agtgcagtgc aactcatatg gtgcatgaca gcctggcagc cccgagcccg gaggtgtcga	1620
caagcctctg aacttgggtct tcaacttcgt gagtactggc gcgcttcctg agcacacgtt	1680
cgaacaaagc ctgataccat gcagaacggc accaacttct tcatcaacga ccacaccttt	1740
gtcccgcctg ctgtcccagt cttgctacaa atcctcagtg gggcgagggc ggctcaggac	1800
ctggtcccgg agggcagcgt gttcgttctt cccagcaact cgtccattga gatatccttc	1860
cctgccactg ccaatgcccc tggattcccc catccgttcc acttgcacgg tgtacgtctg	1920
ccttccccctc gtctaaaggc ggagtcgata totgactccc atcacagcac gccttcgctg	1980
tcgtccggag cgccggggagc agcgtctaca actacgacaa cccgatcttc cgcgacgtcg	2040
tcagcaccgg ccagcccggc gacaacgtca cgattcgctt cgagaccaat aaccagggcc	2100
cgtggttctt ccaactgccac attgacttcc acctcgacgc aggttttgct gtagtcatgg	2160
ccgaggacac tccggacacc aaggccgcga acctgttcc tcaggcgtgg tcggacttgt	2220
gccccatcta tgatgcactt gaccccagcg acctctgagc gggattgtta ctgtgacctg	2280
gtgtgggggg aacatgtcga gggctttcat cgatcagggc ctttcaagggt tggcataata	2340
tacctcacgg cctggatgac tcggacagcg tgtgggcgtg ggtgtaactc tgcttgatgt	2400
tgaaaaaagg attttatgta gaacaattta tgagcaatca gcaatcaata ggattgtgtc	2460
ggtttcgacg aaatgtcttg tctccctgac attacttttg gtgcgagaaa tgggtccatg	2520
atacacatca ttgagctctc aataccaaga aggattacc atgtcaatac ccaagatcat	2580
gtcttcgctg tccgcaatgg totcatgttg cgttgagcag atcgagtagc gttgaaaagc	2640
gattagtatt acatgcaaca tgcaacattt ggaagggggc atgcagaggt tcagctcgcg	2700
tcagtcggcc aagtagcgac ctttgccgca ctgcctgtta acctgaacgt atgcttcaga	2760
actccgtcgg tatcgagagc gatcgtgtac gttccgggat agatccattg atccccgctc	2820
tggtcggcgc gtgcgatggc cccgagcgtc accggcagct tcgcgatcgc gcttttccta	2880
ggggcgaggc cgtgtacccg cgtgtacgag acgagctgct tggtcgggtg gggcgaaggc	2940
ccgaaggagc cactcacgaa gagcaatgcg acgtaatccg aggtagcctt gcccggttta	3000
gtcacacgca cggagaacgt gtcgagcggc gcgaggtcga ggaaggcggc gctcttctga	3060
ccgcgctgta cgaggtcgga aatcgaatac gtcgatggcg gtccctccaa gtccgtgacg	3120
ttggtcgcgt cggccgcgcg gcctggagct gcccaagaga aatcgaagggt ggtgaagtgc	3180
agtccaaagc caaattcgta gaccggcgtg ccggtgtacc acttgatatg acgccccggg	3240
ttcgacgcgc ttgggcgaag ggtcatgtca gtcacgggaa cctgatcagc gtagatggct	3300
gggtattggg tgatgggcag gcgtcctgca g	3331

- 3 -

<210> 2
 <211> 518
 <212> PRT
 <213> Pycnopus cinnabarinus

<400> 2

Met Ser Arg Phe Gln Ser Leu Phe Phe Val Leu Val Ser Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Ala Asn Ala Ala Ile Gly Pro Val Ala Asp Leu Thr Leu Thr
 20 25 30

Asn Ala Gln Val Ser Pro Asp Gly Phe Ala Arg Glu Ala Val Val Val
 35 40 45

Asn Gly Ile Thr Pro Ala Pro Leu Ile Thr Gly Asn Lys Gly Asp Arg
 50 55 60

Phe Gln Leu Asn Val Ile Asp Gln Leu Thr Asn His Thr Met Leu Lys
 65 70 75 80

Thr Ser Ser Ile His Trp His Gly Phe Phe Gln Gln Gly Thr Asn Trp
 85 90 95

Ala Asp Gly Pro Ala Phe Val Asn Gln Cys Pro Ile Ala Ser Gly His
 100 105 110

Ser Phe Leu Tyr Asp Phe Gln Val Pro Asp Gln Ala Gly Thr Phe Trp
 115 120 125

Tyr His Ser His Leu Ser Thr Gln Tyr Cys Asp Gly Leu Arg Gly Pro
 130 135 140

Phe Val Val Tyr Asp Pro Asn Asp Pro His Ala Ser Leu Tyr Asp Ile
 145 150 155 160

Asp Asn Asp Asp Thr Val Ile Thr Leu Ala Asp Trp Tyr His Val Ala
 165 170 175

Ala Lys Leu Gly Pro Arg Phe Pro Phe Gly Ser Asp Ser Thr Leu Ile
 180 185 190

Asn Gly Leu Gly Arg Thr Thr Gly Ile Ala Pro Ser Asp Leu Ala Val
 195 200 205

Ile Lys Val Thr Gln Gly Lys Arg Tyr Arg Phe Arg Leu Val Ser Leu
 210 215 220

- 4 -

Ser Cys Asp Pro Asn His Thr Phe Ser Ile Asp Asn His Thr Met Thr
 225 230 235 240

Ile Ile Glu Ala Asp Ser Ile Asn Thr Gln Pro Leu Glu Val Asp Ser
 245 250 255

Ile Gln Ile Phe Ala Ala Gln Arg Tyr Ser Phe Val Leu Asp Ala Ser
 260 265 270

Gln Pro Val Asp Asn Tyr Trp Ile Arg Ala Asn Pro Ala Phe Gly Asn
 275 280 285

Thr Gly Phe Ala Gly Gly Ile Asn Ser Ala Ile Leu Arg Tyr Asp Gly
 290 295 300

Ala Pro Glu Ile Glu Pro Thr Ser Val Gln Thr Thr Pro Thr Lys Pro
 305 310 315 320

Leu Asn Glu Val Asp Leu His Pro Leu Ser Pro Met Pro Val Pro Gly
 325 330 335

Ser Pro Glu Pro Gly Gly Val Asp Lys Pro Leu Asn Leu Val Phe Asn
 340 345 350

Phe Asn Gly Thr Asn Phe Phe Ile Asn Asp His Thr Phe Val Pro Pro
 355 360 365

Ser Val Pro Val Leu Leu Gln Ile Leu Ser Gly Ala Gln Ala Ala Gln
 370 375 380

Asp Leu Val Pro Glu Gly Ser Val Phe Val Leu Pro Ser Asn Ser Ser
 385 390 395 400

Ile Glu Ile Ser Phe Pro Ala Thr Ala Asn Ala Pro Gly Phe Pro His
 405 410 415

Pro Phe His Leu His Gly His Ala Phe Ala Val Val Arg Ser Ala Gly
 420 425 430

Ser Ser Val Tyr Asn Tyr Asp Asn Pro Ile Phe Arg Asp Val Val Ser
 435 440 445

Thr Gly Gln Pro Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg Phe Glu Thr Asn Asn
 450 455 460

Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu Asp Ala
 465 470 475 480

Gly Phe Ala Val Val Met Ala Glu Asp Thr Pro Asp Thr Lys Ala Ala

485

- 5 -
490

495

Asn Pro Val Pro Gln Ala Trp Ser Asp Leu Cys Pro Ile Tyr Asp Ala
 500 505 510

Leu Asp Pro Ser Asp Leu
 515

<210> 3
 <211> 2527
 <212> ADN
 <213> *Pycnopus cinnabarinus*

<400> 3
 agatctccga accagaaatg cgattgcgtt caggcccaat taagaataaa gctgcgtcag 60
 ggcagcgacg tatcttgatc catcattgac tcaccggcat cggcgtcaac accaaagcaa 120
 gctcgtccca cccataggcg tgcaccggcc ggcgtgcgcc attgaggtag atgagcgggg 180
 cgaaagtccg ccattggtag ccctgtcgtg gacgcgcggc gatgaaacgt ttcccaccat 240
 tgggaagaaa cgtctgcggc ccatcatccc ttcaccggat gacaaggcgg cgtcgcgcct 300
 ttgcgcgaga ggccggcggg cgacatgcac agcgaaggct cgttgcggat gggaagcagg 360
 caatcagtgg gtgtcctacg cgcaccgat ggtcggggag cgtaggcgcc ctcccataag 420
 ggggcaagca tcatgatgct ctccgattcg ggaagcctgg tgcgatgctg gagagactct 480
 ctccgagaga ccagtgtgcg caacgttcct ggctggaag actttaaggt gagtgtagaa 540
 gggcgagcag aggacgatca tcggattgca ggaaccatcg gcatcctcag cctgggaagg 600
 atggctcttg gtagacattc gcggaagggt tcctagatgt gagcgggctt cttggatgat 660
 catgtcgtaa ctttttctga cctcgtcggg ggtacgcatt gcaggattga gcattacggg 720
 atgcctocca ttcataaacg ataaccctt ccttcagggt ggtcatctcc atagagcggc 780
 acgctctcaa ggcctagggt attcacacct ccttcgcaac atccctattc acgggtgtctg 840
 taaggaacga cttgtcatgg gatcacatga agtgcagcat actgttcgcc ggtctcgcag 900
 tacagacgct agtacgggaa gtcgacatcc aagcgttcag tcaccacatg gcaaaaaagc 960
 tgcaccatac tctttatggg gagttgttcg tgagtggat acagtcattc atgagggaat 1020
 gccacccgga tagggtgtgg cgcccgcaat attcatcgcc tggcaatagt cgatgtgcgt 1080
 ccttggtcaa tgaatatcat ggggtcacatg tggagacggg taaacagcgt tgactgtgaa 1140
 tccctgggtg gtgttggggc gaacaggtag gttgcaggaa caccaatatc tcttcggcag 1200
 cccagttctt tgcgagcggc acaggcaggc atcgcgcaac agatcccagc catccggcct 1260
 ctgacattcg ggatacctga agcccttcag gtacggagcg aagagggtgg ctctctgcag 1320
 cgattggcgg acggatagct gtatttcctc tctcaccatt gggaagatgt gaaaggctcc 1380
 atcatatagc ggctcaactc tacctcgaat gtocaaacac ggcgggaata cttatttatg 1440

- 6 -

tggaacaaggc	cgagctatga	tagcttgctc	ccgaagttgg	taagtcccgc	aatctgcggt	1500
tcaggcaaca	gtctcggaaa	aataagaaga	atattgtagg	tgctgtagg	cgtatcgccc	1560
aatgcgcac	acacggaggc	tttaggagat	gaagcgccc	tgagcggtaa	gggagttggt	1620
tcaccgccc	cccgaccgac	tctctctctt	tcccagcatc	atgtctcggc	gcaaacttta	1680
ccctctattg	accaactcca	cgagaaagca	ggaacagctt	ccttgctctc	catgacgtcc	1740
gcaatccaga	cccttagccg	gttcgttact	catcgttatc	cctgccgcca	tggtagtggg	1800
gtcagcctgg	ccagtgcgta	gtcccgtctc	tcttgctgca	ctagagaagc	cccatgagac	1860
agcgtttttt	gctttatttc	tgctgtttct	atagacacca	taggggcaaa	cgatcctgca	1920
cgcccagagg	tattgggctc	gtcagattcc	cagtttttct	cctcggtctg	aatcggtgct	1980
acggcagata	aatcgccgg	aaatgctata	gcccttcata	gcccgtatg	agagtcgcaa	2040
aaggcttgct	agtcaggctg	gtcagtggtc	tctcacgaag	agcgtcaact	tcgcgcgaca	2100
gccgccttct	agggcaagat	agatcctccc	atcatccctt	actgcgtcca	gcgccggtac	2160
cgaacaattg	acttacccgac	atcctccggg	acgcgcaaat	gctgttcgac	ggaacgtaat	2220
cctcttcgct	ccgcctcttt	tcgctctcac	gcattccgtg	tggttcgcgc	gacggccgct	2280
catcaggacc	agaccagtct	caatgtctgg	taccggcaca	atggtgacac	tgccggcaact	2340
gagtaggtct	ggtoactctg	gtgcaccgtc	gcttaagctg	accttcggga	tactgtcctg	2400
cagacatctg	gagcgccgtg	ctttccctta	gtataaatga	tgtctgtccg	caggtccttg	2460
aagaccgctc	gagtccact	tgagttttag	gtaggacctg	tcaccaaacc	ccctctttct	2520
gatcatg						2527

<210> 4

<211> 643

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Séquence promotrice du vecteur pEGT

<400> 4

cgaccgagcg	cgccgacccc	agcctatccc	gcgcgggtcg	ggacccaaaa	taagcggggc	60
ccgccgcgcc	ccgtcggggc	agcgggtgta	tctacgaacg	gaactgggag	gcgactcgga	120
agagtttggg	tagaaagggg	aacaccatcg	cggacggccc	agtgtctctg	dcagctgagc	180
gtgcattgtg	ttcaattctg	acctgtggca	tgtaagggaac	gtgctcggga	tcggaggggtg	240
gcgcgagagc	ctcttcgggtg	tgagattagt	aactgtactg	cgaagccgcg	gagggggttag	300
gatgagaggt	agacaggggtc	gcagcccagg	tgcgagaagg	actgcgaagg	actgttcttc	360
gaccgcgcac	ctgcaattgc	gcgcattggat	agaatagagc	gtcgccctcg	aggggggactc	420
gaccaggggt	ggtggtggcg	cccgacggga	ctggctgggc	atttgacagat	ggcgcgagct	480
ccaggccgcc	gccgatgtgt	tcatcccgtt	ttgtcagtat	cgatcggatc	tttcggggcgt	540

- 7 -

gggtataaaa gcgcgcccgc egccgtctcc ctctttctcc agcactccca tccagagcac 600
 ttccctctcc catcgcatcc catcacacaa taatgcccac cac 643

<210> 5
 <211> 1033
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Séquence promotrice du vecteur pESC

<400> 5
 agcttctccg gccccgaatc gaacggcagg atgtgtgggc gtgtccaata ttgccatgaa 60
 aatctgtcag aagtgagccc tctcgtcacc ctgtacagct tcgctgagtt gaaaagcagg 120
 gttcatcttg ggctcactga tgcactgagc tcgaccggag aactaaatga ccagccggag 180
 tgttcactaa cttaacgccg ggtattcagg gcagcttctc tatgttgccg ctacgacgta 240
 gatcaccgcc catgaacggg ggaaacgggg aggggtgcgt ttggtacgtc tttacgtctg 300
 gctatgttgt attgaccagc gtctgcagaa gatgggcacg acgatgcgcc gagccggcca 360
 gtgtcgtcgg atgtccactg ttgaggccat ctttttgcta gacagacgga agagctttgg 420
 aggtgcgatt cctctacgaa tgggaagggg cttagatgga gagtgacacg tctgagctcc 480
 ccaacacgcc ttgcgcgagg gtgcgtctcc gcggacattc acctcagttc attgttctga 540
 cctgcctaatt tgtatagacc ggccaacaac cttgctgacg cccatcataa cagtgccctg 600
 cacagagcct tcccactcag tcggcgccctc cctcaatcaa tcccactaac tcgccggctc 660
 tgcccccttg ccgctcgaca cgtcgcttgg aagagcccg gcacggggcgt ccgctcccc 720
 cttccctccg cgtcgctcatg cagcgagcgt taatgttgct gcaggcgagc cgtaagtata 780
 ttcaaaggcg tagcgaatga atagcaggcg cgcggggacc tggcacgcgc ggcataaaca 840
 tgcagacttg ggtgacgata acttgaactc agacgcggcg aatgaatatc caaacgcgcg 900
 ggaagaaaat aatttacggg agcctcccca ggtataaaag cccctcacc gctcactctt 960
 tctccagteg aacaccccag ttcaactacc cagcccttcc ttccttcgct atccttcytc 1020
 acaacctgct cgc 1033

<210> 6
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Amorce PCR

<400> 6
 caytggcayg grttcttcc 19

<210> 7

- 8 -

<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Amorce PCR

<400> 7
gagrtggaag tcratgtgrc

20

<210> 8
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Amorce PCR

<400> 8
ggataactac tggatccgcg

20

<210> 9
<211> 19
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Amorce PCR

<400> 9
cgcagtattg cgtggagag

19

<210> 10
<211> 19
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Amorce PCR

<400> 10
gacatctgga gcgcctgtc

19

<210> 11
<211> 27
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Amorce PCR

<400> 11
atcgaagggtt ccgatgactg acatgac

27

<210> 12
<211> 5122
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

- 9 -

<223> Séquence du vecteur pEGT

<400> 12

catgggatat cgcattgcctg cagagctcta gagtcgacgg gcccggtacc gcggccgcct	60
taagacgcgt ggatccgcag gtgaacgcgc ctatcgggtg gatattcggg cgacgggagc	120
ctcggcaatc tgagcctcgt tactgcctag caaattcgga atcccttcga tgtcataggg	180
tcgcggaaca gtgatcgtct tgctacatac tccaagggtg tgactcattc cctcgataat	240
gaacattgtt gttgttggtt gttctctatc cgctcagtcg cgcgaccca cactgcatg	300
gttgaacttc gccacgcaac aaccgcatga cgacatggcg aacctaaagta aaggctgagt	360
cgtggactaa agcactccac tttaaggcga ggatgccagt ctacgtcatg aatgaagcct	420
caggccccga agtaaggggg tacaaaagga gggtgaaagg tggacgtttt cttaccatcc	480
ttccacctcc cagaccacca tgccgggaat tcccagcttg ctcaaaaagg ttctgcccgt	540
acgcccgcga aattccttcg aggtggcccc tatcgcatac atgcacgact tcaaacatc	600
cattctatca ttttgggacg gtacaattat tagacatgtt gtacaacgtt acattccttt	660
cttcttttac tctccggccc agtctatgta gaggtaaagt acaagcgtcc aaaggatcag	720
gcacttagag cgcgcgctct tgcttcgcgc cttagagcgc gccgtcctgc ttccgcgcgt	780
agacgagcag gtcgcagaca cggcgggagt agccccactc gttgtcgtac caggcaatga	840
gcttcacgaa gctcttgctg atcgcgatgc cggggatcga tccacgcgtc ttaaggcggc	900
cgcggtaccc cctcggaccc gtcgggcccgc gtcggaccgg cgggtgttgg cggcgtcgg	960
cagtcctgct cctcggccac gaagtgcacg cagttgccgg ccgggtcgcg cagggcgaac	1020
tcccgcccc acggtctctc gccgatctcg gtcattggcc gcccgaggc gtcccggaag	1080
ttcgtggaca cgacctccga ccaactcggc tacagctcgt ccaggccgcg caccacacc	1140
caggccaggg tggtgtccgg caccacctgg tccggaccg cgctgatgaa cagggtcacg	1200
tcgtcccga ccacaccggc gaagtcgtcc tccacgaagt cccgggagaa cccgagccgg	1260
tcggtccaga actcgaccgc tccggcgacg tcgcgcgcgg tgagcaccgg aacggcactg	1320
gtcaacttgg ccatgcatgg tgatgggcat tatgtgtgat gggatgcgat gggagagggg	1380
agtgtcttgg atgggagtg tggagaaaga gggagacggc gggcggcgcg ccttttatac	1440
ccacgcccga aagatccgat cgatactgac aaaacgggat gaacacatcg gcggcggcct	1500
ggactgcgcg ccatctgcaa atgcccagc agtcccgtcg ggcgccacca ccagccctgg	1560
tcgagtcctc ctcgagggcg acgctctatt ctatccatgc gcgcaattgc aggtgcgcgg	1620
tcgaagaaca gtccttcgca gtccttctcg cacctgggct gcgaccctgt ctacctctca	1680
tcctaacccc tccgcggctt cgcagtacag ttactaatct cacaccgaag aggtctctcg	1740
gccaccctcc gatcccgagc acgttcctta catgccacag cgtcagaatt gaacacaatg	1800
cacgtcarat cagatccccg ggaattcgta atcatggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa	1860

- 10 -

ttgttatccg	ctcacaatc	cacacaacat	acgagccgga	agcataaagt	gtaaagcctg	1920
gggtgcctaa	tgagtgaagt	aactcacatt	aattgcgttg	cgctcactgc	ccgctttcca	1980
gtcgggaaac	ctgtcgtgcc	agctgcatta	atgaatcggc	caacgcgcgg	ggagaggcgg	2040
tttgcgatt	gggcgctctt	ccgcttcttc	gctcactgac	tcgctgcgct	cggtcgctcg	2100
gctgcggcga	gcggtatcag	ctcactcaaa	ggcggttaata	cggttatcca	cagaatcagg	2160
ggataacgca	ggaaagaaca	tgtgagcaaa	aggccagcaa	aaggccagga	accgtaaaaa	2220
ggccgcgttg	ctggcggttt	tccataggct	ccgccccct	gacgagcatc	acaaaaatcg	2280
acgctcaagt	cagagggtgg	gaaacccgac	aggactataa	agataccagg	cgtttcccc	2340
tggaaagctcc	ctcgtgcgct	ctcctgttcc	gacctgcgc	cttaccggat	acctgtccgc	2400
ctttctccct	tcgggaagcg	tggcgctttc	tcatatgctca	cgctgtaggt	atctcagttc	2460
ggtgtaggtc	gttcgctcca	agctgggctg	tgtgcacgaa	cccccggttc	agcccgaccg	2520
ctgcgcctta	tccggttaact	atcgtcttga	gtccaaccgc	gtaagacaag	acttatcgcc	2580
actggcagca	gccactggta	acaggattag	cagagcgagg	tatgtaggcg	gtgctacaga	2640
gttcttgaag	tgggtggccta	actacggcta	cactagaagg	acagtatttg	gtatctgcgc	2700
tctgctgaag	ccagttacct	tcggaaaaag	agttggtagc	tcttgatccg	gcaaacaaac	2760
caccgctggg	agcgggtggt	tttttgtttg	caagcagcag	attacgcgca	gaaaaaaagg	2820
atctcaagaa	gaccccttga	tcttttctac	ggggtctgac	gctcagtgga	acgaaaactc	2880
acgttaaggg	attttggtca	tgagattatc	aaaaaggatc	ttcacctaga	tccttttaaa	2940
ttaaaaaatga	agttttaaat	caatctaaag	tatatatgag	taaacttggt	ctgacagtta	3000
ccaatgctta	atcagtggag	cacctatctc	agcgatctgt	ctatttcggt	catccatagt	3060
tgctgactc	cccgtcgtgt	agataactac	gatacgggag	ggcttaccat	ctggccccag	3120
tgctgcaatg	ataccgcgag	acccacgctc	accggctcca	gatttatcag	caataaacca	3180
gccagccgga	agggccgagc	gcagaagtgg	tcctgcaact	ttatccgcct	ccatccagtc	3240
tattaattgt	tgccgggaag	ctagagtaag	tagttcgcca	gttaatagtt	tgcgcaacgt	3300
tggtgccatt	gctacaggca	tcgtggtgtc	acgctcgtcg	tttggtatgg	cttcattcag	3360
ctccggttcc	caacgatcaa	ggcgagttac	atgatcccc	atgttggtgca	aaaaagcggg	3420
tagctccttc	ggtcctccga	tcgttggtcag	aagtaagttg	gccgcagtg	tatcactcat	3480
ggttatggca	gcactgcata	attctcttac	tgctcatgcca	tcgtaagat	gcttttctgt	3540
gactgggtgag	tactcaacca	agtcattctg	agaatagtg	atgcggcgac	cgagttgctc	3600
ttgcccggcg	tcaatacggg	ataataccgc	gccacatagc	agaactttaa	aagtgtctcat	3660
cattggaaaa	cgttcttcgg	ggcgaaaact	ctcaaggatc	ttaccgctgt	tgagatccag	3720
ttcgatgtaa	cccactcgtg	cacccaactg	atcttcagca	tcttttaact	tcaccagcgt	3780
ttctgggtga	gcaaaaaacag	gaaggcaaaa	tgccgcaaaa	aagggaataa	gggcgacacg	3840

- 11 -

```

gaaatgttga atactcatat tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcaggggta 3900
ttgtctcatg agcggatata tatttgaatg tatttagaaa aataaataaa taggggttcc 3960
gcgacacattt ccccgaaaag tgccacctga cgtctaagaa accattatta tcatgacatt 4020
aacctataaaa aataggcgta tcacgaggcc ctttcgtctc gcgcgtttcg gtgatgacgg 4080
tgaaaacctc tgacacatgc agctcccgga gacgggcaca gcttgtctgt aagcggatgc 4140
cgggagcaga caagcccgtc agggcgcgctc agcgggtgtt ggcgggtgtc ggggctggct 4200
taactatgcg gcatcagagc agattgtact gagagtgcac catatgcggg gtgaaatacc 4260
gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat caggcgccat tcgccattca ggctgcgcaa 4320
ctgttgggaa gggcgatcgg tgccgggctc ttcgtatta cgccagctgg cgaaaggggg 4380
atgtgtctgca aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt tccagtcac gacgttgtaa 4440
aacgacggcc agtgccaagc ttgcatgcct gcaggtcgac gaccgagcgc gcgccacca 4500
gcctatcccg cgcgggtcgg gacccaaaat aagcgggccc cgcgcgccc cgtcgggcca 4560
gcgggtgtat ctacgaacgg aactgggagg cgactcgaa gagtttggtt agaaagggga 4620
acaccatcgc ggacggccca gtgctctggd cagctgagcg tgcatttgtt tcaattctga 4680
cctgtggcat gtaaggaacg tgctcgggat cggagggtgg cgcgagagcc tcttcggtgt 4740
gagattagta actgtactgc gaagcccgcg aggggttagg atgagaggta gacagggtcg 4800
cagcccaggt gcgagaagga ctgcgaagga ctgttcttcg accgcgcacc tgcaattgcg 4860
cgcatggata gaatagagcg tcgccctcga gggggactcg accagggctg gtgggtggcg 4920
ccgacgggac tggctgggca tttgcagatg gcgcgcagtc caggccgccc ccgatgtgtt 4980
catcccgttt tgtcagtatc gatcggatct ttcgggcgtg ggtataaaag cgcgccgccc 5040
gccgtctccc tctttctcca gactcccat ccagagcact tccctctccc atcgcatccc 5100
atcacacaat aatgcccatc ac 5122

```

<210> 13
 <211> 5490
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Séquence du vecteur pESC

```

<400> 13
agcttctccg gccccgaatc gaacggcagg atgtgtgggc gtgtccaata ttgcatgaa 60
aatctgtcag aagtgaagcc tctcgtcacc ctgtacagct tcgctgagtt gaaaagcagg 120
gttcactctt ggctcactga tgcactgagc tcgaccggag aactaaatga ccagccggag 180
tgttcactaa cttaacgccc ggtattcagg gcagcttctc tatgttgccg ctacgacgta 240
gatcaccgcc catgaacggg ggaaacgggg aggggtgcgt ttggtacgtc ttacgtctg 300

```

- 12 -

gctatgttgt attgaccagc gtctgcagaa gatgggcacg acgatgcgcc gagccggcca	360
gtgtcgtcgg atgtccactg ttgaggccat ccttttgcta gacagacgga agagctttgg	420
aggtgcgatt cctctacgaa tgggaagggg cttagatgga gagtgcacg tctgagctcc	480
ccaacacgcc ttgcgcgagg gtgcgtctcc gcggacatcc acctcagttc attgtttctga	540
cctgcctaatt tgtatagacc ggccaacaac cttgctgacg cccatcataa cagtgcacctg	600
cacagagcct tcccactcag tgggcgcctc cctcaatcaa tcccactaac tcgcccggctc	660
tgccccctcg ccgctcgaca cgtcgcttgg aagagcccg gcacggggcgt ccgctcccc	720
cttccctccg cgctcgcatg caccgcagcgt taatgttget gcaggcgagc cgtaagtata	780
ttcaaaggcg tagcgaatga atagcaggcg cgcggggacc tggcacgcgc ggcataaaca	840
tgcagacttg ggtgacgata acttgaactc agacgcggcg aatgaatatc caaacgcgcg	900
ggaagaaaat aatttacggg agcctcccca ggtataaaag cccctcacc gctcactctt	960
tctccagtcg aacaccccag ttcaactacc cagcccttcc ttccttcgct atccttcytt	1020
acaacctgct cgccatggga tatcgcatgc ctgcagagct ctagagtcga cgggcccggg	1080
accgcggccg ccttaagacg cgtggatccg caggtgaacg cgcctatcgg tgggatattc	1140
gggcgacggg agcctcggca atctgagcct cgttactgcc tagcaaattc ggaatccctt	1200
cgatgtcata gggtcgcgga caagtgatcg tcttgctaca tactccaagg tgttgactca	1260
ttccctcgat aatgaacatt gttgttgtg tttgttctct atccgctcag tcacgcgacc	1320
ccacacgtgc atggttgaac ttgcgccgc aacaaccgca tgacgacatg gcgaacctaa	1380
gtaaaggctg agtcgtggac taaagcactc cactttacgg cgaggatgcc agtctacgtc	1440
atgaatgaag cctcaggtcc cgaagtaagg gggtagaaaa ggagggtgaa aggtggacgt	1500
tttcttacca tcttccacc tcccagacca ccatgccggg aattcccagc ttgctcaaaa	1560
aggttctgcc cgtacgcccg cgaaattcct tcgaggtggc ccctatcgca tacatgcacg	1620
acttcaaaac atccattcta tcattttggg atcgtacaat tattagacat gttgtacaac	1680
gttacattcc tttcttcttt tactctccgg cccagtctat gtagaggtaa agtacaagcg	1740
tccaaaggat caggcactta gagcgcgccg tcttgcttcg ccgcttagag cgcgccgtcc	1800
tgtctcgccg cgtagacgag caggtcgcag acacggcggg agtagcccca ctggttgctg	1860
taccaggcaa tgagcttcac gaagctcttg ctgatcgca tgccggggat cgatccacgc	1920
gtcttaaggc ggccgcggta cccctcggga cccgtcgggc cgcgtcggac cggcgggtgtt	1980
ggtcggcgctc ggtcagtcct gctcctcggc cacgaagtgc acgcagttgc cggccgggtc	2040
gcgcagggcg aactcccgc cccacggctg ctgcgccatc tcggtcatgg ccggcccggga	2100
ggcgtcccgg aagttcgtgg acacgacctc cgaccactcg gcgtacagct cgtccaggcc	2160
gcgcacccac acccaggcca ggggtgtgtc cggcaccacc tggtcctgga ccgcgctgat	2220
gaacagggtc acgtcgtccc ggaccacacc ggcgaagtcg tcctccacga agtcccggga	2280

- 13 -

gaacccgagc	cggtcgggtcc	agaactcgac	cgctccggcg	acgtcgcgcg	cggtgagcac	2340
cggaacggca	ctgggtcaact	tggccatgca	tgggtgatggg	cattatgtgt	gatgggatgc	2400
gatgggagag	ggaagtgtc	tggatgggag	tgctggagaa	agagggagac	ggcgggcggc	2460
gcgcctttta	taccacgccc	cgaaagatcc	gatcgatact	gacaaaacgg	gatgaacaca	2520
tccggcggcg	cctggactgc	gcgccatctg	caaatgccc	gccagtcccg	tccggcgcca	2580
ccaccagccc	tggtcgagtc	cccctcgagg	gcgacgctct	attctatcca	tgcgcgcaat	2640
tgcaggtgcg	cggtcgaaga	acagtccttc	gcagtccttc	tgcacactgg	gctgcgaccc	2700
tgtctacctc	tcattccta	ccctccggcg	cttcgcagta	cagttactaa	tctcacaccg	2760
aagaggctct	cgcgccaccc	tccgatcccg	agcacgttcc	ttacatgcca	cagcgtcaga	2820
attgaacaca	atgcacgtca	ratcagatcc	ccgggaattc	gtaatcatgg	tcatagctgt	2880
ttcctgtgtg	aaattgttat	ccgctcacia	ttccacacia	catacgagcc	ggaagcataa	2940
agtgtaaagc	ctgggggtgcc	taatgagtga	gctaactcac	attaattgcg	ttgcgctcac	3000
tgcccgcctt	ccagtcggga	aacctgtcgt	gccagctgca	ttaatgaatc	ggccaacgcg	3060
cggggagagg	cggtttgcgt	attgggcgct	cttcgccttc	ctcgctcact	gactcgctgc	3120
gctcggtcgt	tcggctgcgg	cgagcgggtat	cagctcactc	aaaggcggta	atacggttat	3180
ccacagaatc	aggggataac	gcaggaaaga	acatgtgagc	aaaaggccag	caaaaggcca	3240
ggaaccgtaa	aaaggccgcg	ttgctggcgt	ttttccatag	gctccgcccc	cctgacgagc	3300
atcacaaaaa	tcgacgtca	agtcagaggt	ggcgaaaccc	gacaggacta	taaagatacc	3360
aggcgcttcc	ccctggaagc	tccctcgtgc	gctctcctgt	tccgacctg	ccgcttaccg	3420
gatacctgtc	cgctttcttc	ccttcgggaa	gcgtggcgct	ttctcatagc	tcacgctgta	3480
ggtatctcag	ttcggtgtag	gtcgcttcgt	ccaagctggg	ctgtgtgcac	gaaccccccg	3540
ttcagcccca	ccgctgcgcc	ttatccggta	actatcgtct	tgagtccaac	ccggtaagac	3600
acgacttata	gccactggca	gcagccactg	gtaacaggat	tagcagagcg	aggtatgtag	3660
gcgggtgtac	agagttcttg	aagtgggtggc	ctaactacgg	ctacactaga	aggacagtat	3720
ttgggtatctg	cgctctgctg	aagccagtta	ccttcggaaa	aagagttggg	agctcttgat	3780
ccggcaaaaca	aaccaccgct	ggtagcgggtg	gtttttttgt	ttgcaagcag	cagattacgc	3840
gcagaaaaaaa	aggatctcaa	gaagatcctt	tgatcttttc	tacgggggtct	gacgctcagt	3900
ggaacgaaaa	ctcacgttaa	gggattttgg	tcattgagatt	atcaaaaagg	atcttcacct	3960
agatcctttt	aaattaaaaa	tgaagtttta	aatcaatcta	aagtatatat	gagtaaactt	4020
ggtctgacag	ttaccaatgc	ttaatcagtg	aggcacctat	ctcagcgatc	tgtctatttc	4080
gttcatccat	agttgcctga	ctccccgtcg	tgtagataac	tacgatacgg	gagggccttac	4140
catctggccc	cagtgcgtgca	atgataccgc	gagaccacgc	ctcaccggct	ccagatttat	4200

- 14 -

cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggtcctgca actttatccg 4260
 cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata 4320
 gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctacag gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggta 4380
 tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt 4440
 gcaaaaaagc ggtagctcc ttcggctctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag 4500
 tgttatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa 4560
 gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc 4620
 gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt 4680
 taaaagtgct catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc 4740
 tgttgagatc cagttcgatg taaccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta 4800
 ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa 4860
 taagggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttctt ttttcaatat tattgaagca 4920
 tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac 4980
 aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc tgacgtctaa gaaaccatta 5040
 ttatcatgac attaacctat aaaaataggc gtatcacgag gccctttcgt ctcgcgcggt 5100
 tcggtgatga cggtgaaaac ctctgacaca tgcagctccc ggagacggtc acagcttgtc 5160
 tgtaagcgga tgccgggagc agacaagccc gtcagggcgc gtcagcgggt gttggcgggt 5220
 gtcggggctg gcttaactat gcggcatcag agcagattgt actgagagtg caccatatgc 5280
 ggtgtgaaat accgcacaga tgcgtaagga gaaataaccg catcaggcgc cattcgccat 5340
 tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtgcggc ctcttcgcta ttacgccagc 5400
 tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt 5460
 cagcaggtg taaaacgacg gccagtgcca 5490

<210> 14

<211> 6983

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Séquence du vecteur pELP

<400> 14

catgggatat cgcattgctg cagagctcta gagtgcacgg gcccggtacc gcggccgcct 60
 taagacgcgt ggatccgcag gtgaacgcgc ctatcgggtg gatattcggg cgacggggagc 120
 ctcggaatc tgagcctcgt tactgcctag caaattcgga atcccttcga tgtcataggg 180
 tcgcggaaca gtgatcgtct tgctacatac tccaagggtg tgactcattc cctcgataat 240
 gaacattggt gttgttggtt gttctctatc cgtcagtcga cgcgacccca cagtgcatg 300
 gttgaacttc gccacgcaac aaccgcatga cgacatggcg aacctaaagta aaggctgagt 360

- 15 -

cgtggactaa agcactccac ttacggcgga ggatgccagt ctacgtcatg aatgaagcct	420
caggtcccga agtaaggggg tacaaaagga gggtgaaagg tggacgtttt cttaccatcc	480
ttccacctcc cagaccacca tgccgggaat tcccagcttg ctcaaaaagg ttctgcccgt	540
acgcccgcga aattccttcg aggtggcccc tatcgcatat atgcacgact tcaaaacatc	600
cattctatca ttttgggata gtacaattat tagacatgtt gtacaacgtt acattccttt	660
cttcttttac tctccggccc agtctatgta gaggtaaagt acaagcgccc aaaggatcag	720
gcacttagag cgcgcgctct tgcttcgcgc cttagagcgc gccgtcctgc ttccgcgcgt	780
agacgagcag gtcgcagaca cggcgggagt agccccactc gttgtcgtac caggcaatga	840
gcttcacgaa gctcttgctg atcgcgatgc cggggatcga tccacgcgtc ttaaggcggc	900
cgcggtaccc cctcggaccc gtcggggcgc gtcggaccgg cgggtgttggc cggcgtcggc	960
cagtcctgct cctcggccac gaagtgcacg cagttgcggc ccgggtcgcg caggggcgaac	1020
tcccgcctcc acggtgctc gccgatctcg gtcattggcg gcccgagggc gtcccggaa	1080
ttcgtggaca cgacctccga ccactcggcg tacagctcgt ccaggccgcg caccacacc	1140
caggccaggg tggtgtccgg caccacctgg tctggaccg cgtgatgaa cagggtcacg	1200
tctcccga ccacacggc gaagtctgct tccacgaagt cccgggagaa cccgagccgg	1260
tccgtccaga actcgaccgc tccggcgacg tcgcgcgcgg tgagcaccgg aacggcactg	1320
gtcaacttgg ccatgcatgg tgatgggcat tatgtgtgat gggatgcat gggagaggg	1380
agtgtctg atgggagtg tggagaaaga gggagacggc gggcggcgcg ccttttatac	1440
ccacgcccga aagatccgat cgatactgac aaaacgggat gaacacatcg gcggcggcct	1500
ggactgcgcg ccatctgcaa atgcccagcc agtcccgctg ggcgccacca ccagccctgg	1560
tcgagtcctc ctcgaggcg acgctctatt ctatccatgc gcgcaattgc aggtgcgcgg	1620
tccaagaaca gtccttcgca gtccttctcg caoctgggct gcgaccctgt ctacctctca	1680
tcctaacccc tccgcggctt cgcagtacag ttactaatct cacaccgaag aggtctctgc	1740
gccaccctcc gatcccgagc acgttcctta catgccacag cgtcagaatt gaacacaatg	1800
cacgtcarat cagatccccg ggaattcgta atcatggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa	1860
ttgttatccg ctcaaatc cacacaacat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg	1920
gggtgcctaa tgagtgaagt aactcacatt aattgcgttg cgtcactgc ccgctttcca	1980
gtcgggaaac ctgtcgtgac agctgcatta atgaatggc caacgcgcgg ggagaggcgg	2040
tttgctatt gggcgtctt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggctgttcg	2100
gctgcggcga gcggtatcag ctcaactcaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg	2160
ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa	2220
ggcgcgcttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg	2280

- 16 -

acgctcaagt	cagaggtggc	gaaacccgac	aggactataa	agataccagg	cgtttcccc	2340
tggaagctcc	ctcgtgcgt	ctcctgttcc	gaccctgccg	cttaccggat	acctgtccgc	2400
ctttctccct	tcgggaagcg	tggcgctttc	tcatagctca	cgctgtaggt	atctcagttc	2460
ggtgtaggtc	gttcgctcca	agctgggctg	tgtgcacgaa	cccccgttc	agcccgaccg	2520
ctgcgcctta	tccggtaact	atcgtcttga	gtccaacccg	gtaagacacg	acttatcgcc	2580
actggcagca	gccactggta	acaggattag	cagagcgagg	tatgtaggcg	gtgctacaga	2640
gttcttgaag	tggtggccta	actacggcta	cactagaagg	acagtatttg	gtatctgcgc	2700
tctgctgaag	ccagttacct	tcggaaaaag	agttggtagc	tcttgatccg	gcaaaaaaac	2760
caccgctggg	agcgggtgggt	tttttgtttg	caagcagcag	attacgcgca	gaaaaaaagg	2820
atctcaagaa	gataccttga	tcttttctac	ggggtctgac	gctcagtggg	acgaaaactc	2880
acgttaaggg	attttggcca	tgagattatc	aaaaaggatc	ttcacctaga	tccttttaaa	2940
ttaaaaatga	agtttttaaat	caatctaaag	tatatatgag	taaacttggt	ctgacagtta	3000
ccaatgctta	atcagtgagg	cacctatctc	agcgatctgt	ctatttcggt	catccatagt	3060
tgctgactc	cccgctcgtg	agataactac	gatacgggag	ggcttaccat	ctggccccag	3120
tgctgcaatg	ataccgcgag	accacgcgtc	accggctcca	gatttatcag	caataaacca	3180
gccagccgga	aggcccgagc	gcagaagtgg	tcctgcaact	ttatccgoot	ccatccagtc	3240
tattaattgt	tgccgggaag	ctagagtaag	tagttcgcca	gttaatagtt	tgcgcaacgt	3300
tggtgccatt	gctacaggca	tcgtgggtgc	acgctcgtcg	tttggtatgg	cttcattcag	3360
ctccggttcc	caacgatcaa	ggcgagttac	atgatcccc	atgttggtgca	aaaaagcggg	3420
tagctccttc	ggtcctccga	tcgttgctcag	aagtaagttg	gccgcagtgt	tatcactcat	3480
ggttatggca	gcactgcata	attctctttac	tgtoatgcca	tcctgaagat	gcttttctgt	3540
gactgggtgag	tactcaacca	agtcattctg	agaatagttg	atgccccgac	cgagttgctc	3600
ttgccccggc	tcaatacggg	ataataccgc	gccacatagc	agaacttta	aagtgtcat	3660
cattggaaaa	cgttcttcgg	ggcgaaaaact	ctcaaggatc	ttaccgctgt	tgagatccag	3720
ttcgatgtaa	cccactcgtg	cacccaactg	atcttcagca	tcttttactt	tcaccagcgt	3780
ttctgggtga	gcaaaaacag	gaaggcaaaa	tgccgcaaaa	aagggaataa	gggcgacacg	3840
gaaatgttga	atactcatac	tcttcctttt	tcaatattat	tgaagcattt	atcagggtta	3900
ttgtctcatg	agcggataca	tatttgaatg	tatttagaaa	aataaacaaa	taggggttcc	3960
gcgcacattt	ccccgaaaag	tgccacctga	cgtctaagaa	accattatta	tcatgacatt	4020
aacctataaa	aataggcgta	tcacgaggcc	ctttcgtctc	gcgcgtttcg	gtgatgacgg	4080
tgaaaacctc	tgacacatgc	agctcccgga	gacggtcaca	gcttgctctgt	aagcggatgc	4140
cgggagcaga	caagcccgtc	aggcgcgctc	agcgggtgtt	ggcgggtgtc	ggggctggct	4200
taactatgcg	gcacagagc	agattgtact	gagagtgcac	catatgcggg	gtgaaatacc	4260

- 17 -

gcacagatgc	gtaaggagaa	aataccgcat	caggcgccat	tgcgcattca	ggctgcgcaa	4320
ctgttgggaa	gggcgatcgg	tgcgggcctc	ttcgcattta	cgccagctgg	cgaaaggggg	4380
atgtgctgca	aggcgattaa	gttgggtaac	gccagggttt	tcccagtcac	gacgttgtaa	4440
aacgacggcc	agtccaagc	ttagatctcc	gaaccagaaa	tgcgattgcg	ttcaggccca	4500
attaagaata	aagctgcgtc	agggcagoga	cgtatcttga	tccatcattg	actcaccggc	4560
atcggcgtca	acaccaaagc	aagctcgtcc	cacccatagg	cgtgcaccgg	ccggcgtgcg	4620
ccattgaggt	acatgagcgg	ggcgaaagtc	cgccattggt	agccctgctg	tggacgcgcg	4680
gcgatgaaac	gtttcccacc	attgggaaga	aacgtctgcg	gcccacatc	ccttcaccgg	4740
atgacaaggc	ggcgctcgcg	ctttgccgca	gaggccggcg	ggcgacatgc	acagcgaagg	4800
tccgttgccg	atgggaagca	ggcaatcagt	gggtgtccta	cgccgccacg	atggtcgggg	4860
agcgtaggcg	ccctcccata	aggcggcaag	catcatgatg	ctctccgatt	cggaagccct	4920
ggcgcatg	tggagagact	ctctccgaga	gaccagtgtg	cgcaacgttc	ctggcctgga	4980
agactttaaa	gtgagtgtag	aaggcgagc	agaggacgat	catcggtatt	caggaaccat	5040
cggcatcctc	agcctgggaa	ggatggctct	tggtagacat	tgcgggaagg	tgtcctagat	5100
gtgagcgggc	ttcttggtat	atcatgtcgt	aactttttct	gacctcgctg	gtggtaacga	5160
tggcaggatt	gagcattacg	gtatgcctcc	cattcataaa	cgataacccc	ttccttcagg	5220
ttggctcatc	ccatagagcg	gcacgctctc	aaggcctagg	ctattcacac	ctccttcgca	5280
acatccctat	tcacgggtgtc	tgtaaaggaac	gaactgtcat	gggatcacat	gaagtgcagc	5340
atactgttcg	cgggtctcgc	agtacagacg	ctagtacggg	aagtcgacat	ccaagcgttc	5400
agtcaccaca	tggcaaaaaa	gctgcaccat	actctttatg	gtgagttggt	cgtgagtggt	5460
atacagtcac	tcatgagggg	atgcccaccg	gataggggtg	ggcgcccgca	atattcatcg	5520
cctggcaata	gtcgatgtgc	gtccttggtc	aatgaatatc	atgggtcaca	tgtggagacg	5580
gttaaacagc	gttgactgtg	aatccctggg	gtgtgttggg	ccgaacaggt	acgttgacgg	5640
aacaccaata	tctcttcggc	agcccagttc	tttgcgagcg	gcacaggcag	gcacgcgcga	5700
acagatccca	gccatccggc	ctctgacatt	cgggatacct	gaagcccttc	aggtacggag	5760
cgaagaggtg	ggctctctgc	agcgattggc	ggacggatag	ctgtatttcc	tctctcacca	5820
ttgggaagat	gtgaaaggct	ccatcatata	gcggctcaac	tctacctcga	atgtccaaac	5880
acggcgggaa	tacttattta	tgtggacaag	gccgagctat	gatagcttgc	tcccgaagtt	5940
ggtaagtccc	gcaatctgcg	gttcaggcaa	cagtctcgga	aaaataagaa	gaatattgta	6000
gggtgcgtgta	ggcgatctgc	ccaaatgcgc	acacacggag	gctttaggag	atgaagcgcc	6060
cgtgagcggg	aaggaggttg	gttcaccgcc	gccccgaccg	actctctctc	tttcccagca	6120
tcattgtctg	gcgcaaactt	tacctcttat	tgaccaactc	cacgagaaag	caggaacagc	6180

- 18 -

tcccttgctc	ctcatgacgt	ccgcaatcca	gacccttagc	cggttcgta	ctcatcgta	6240
tccctgccgc	catogtagtg	gagtcagcct	ggccagtgcg	tagtcccgtc	tctcttgctg	6300
cactagagaa	gccccatgag	acagcgtttt	ttgctttatt	tctgctgttt	ctatagacac	6360
cataggggca	aacgatcctg	cacgcccaga	ggatttgggc	tcgtcagatt	cccagttttt	6420
ctcctcggtc	tgaatcggct	gcacggcaga	taaatcggcc	ggaaatgcta	tagcccttca	6480
tagcccgccta	tgagagtcgc	aaaaggcttg	tcagtcaggt	cggtcagtg	gctctcacga	6540
agagcgtaaa	cttcgcgcga	cagccgcctt	tcagggcaag	atagatcctc	ccatcatccc	6600
ctactgcgct	cagcgccggt	accgaacaat	tgacttaccg	acatcctccg	ggacgcgcaa	6660
atgtgtttcg	acggaacgta	atcctcttcg	ccccgcctct	tttcgctctc	acgcattccg	6720
tgtggttcgc	gcgacggccg	ctcatcagga	ccagaccagt	ctcaatgtct	ggtaccggca	6780
caatggtgac	actgcggcaa	ctgagtaggt	ctggctactc	tgggtgcaccg	tcgcttacgc	6840
tgaccttcgg	gatactgtcc	tcagacatc	tggagcgcct	gtctttcccc	tagtataaat	6900
gatgtctgtc	cgcaggtcct	tgaagaccgc	tcgagtccca	cttgagtttt	aggtaggacc	6960
tgttcctcca	caacccctct	ttc				6983

<210> 15
 <211> 4395
 <212> ADN
 <213> *Pycnopus sanguineus*

<400> 15	
gagcttactg	gatcttccag agaaatcggt ggagaggctg gccggtcagc ctcaccgaca 60
tttgacgtgg	ccgatgattc tgtggatgcc atcgtgttgg atcctgagct tgcattccatc 120
gccaaagcgc	tcaaagctga ggtgggaagg cagggaggca caccagttcc cgaaggaggc 180
ggacctgaga	ttgtgacgct caagattata tggaaacctc atccgctgaa ccccaacggc 240
cgtccggaac	tctgggctat gaagcagaga cgggtaggtg aagtcgctca tcacgcctcg 300
ttcttactca	ccatcttctg cagcacgaga atttccaccg gctttgttcc gaagtagcgg 360
acctcgcgag	tgttcgtagt gagaacgtcg tgctttccct cgacgggaaa cgcgtgttcc 420
cttcatctac	ccctcacagt gtcggtgtct gggcagaagc tgagctaggt tagtgactta 480
tcctgtgcgt	gacggcacga tgcttactct tcaacagaag cttgtgacaa gatcacctac 540
caatacctgc	aggaaaataa gcgaatgcgt tccgaatccg ttgctccgcc aacctatcct 600
cacctcgacg	acatttcccg tcagtctcca actcgcgcgc gctccccttc catcacccag 660
ctgtccgaga	atgaatccgg cgctgcagag tctggtcctg aagataaggg cacaagcact 720
ggggaggcct	tcagcctgat actcgtgagc gaacggacca agggcaagcg aataaccctc 780
cgtgtgctcc	caaccaccaa atgtggcgtc atagtctgca agttcctaga gaaggccggc 840
ttacaggacg	aataccccga tgtcaccctt gctgcgaatg ggcgaggacg cacgaagacg 900

- 19 -

tcagccaaga caccggcgct gagcgctgat ggagataaga tggatccgga ggcacctatt	960
ggtgatgccg acctggaaga tggggatcaa gtcgaggtgg ttggtctttg atgtagcgag	1020
tgcgtggtgt tacgttttcg tcttgctatc ggtttttctg ctcttgctctt gttagtaagt	1080
agtataatga tggataatca cacaacaacg tatgtgttcc agggacttct ctctcagtgg	1140
gtgtgtggct gattgtacga aacatcgcac aggcctttca ccgctgctcc tagcgcgaga	1200
ccacatgaac gccctcgac gtcagtcggc ctcggaacg atagggcagt gccaaatgca	1260
ggcgaaaatg actcagttag gccacgcctg cgctttaact ttagcgttct aataccctcg	1320
acctccgtag cggctctgtg agcgcggaag gcttggcatc tacgctcttt gtccgggtccg	1380
aagccactac attgagcggg tgcggcggaag ggtgacaaac tgcgaggcgc aagaatgtag	1440
ccgggcctgc ggaaagggtca tgaacaaact atgtcgggcc caaccagtgc taccgacacc	1500
gttctccgtg tttcagtatg ccttcagctg tcgggtggcg ggggtggctcc gatatgtgta	1560
ctcgaaacg ctacacagcg tctttgtatt gccgggtatg tgaccaacgg tgccctcatg	1620
ctcttcgctt gttgatgctc cttcaggaca ccgtctggga ctctggcaag tcagctgctg	1680
ctcgccacag ttctaggaac gtctcaatgc tcttagggcg cggttacagc aaacgccttg	1740
caccgggatg ggcctcggtg cgcgcacag gcgaggtgt cctactcggc gttcgtagt	1800
agccccccat ccacgtaaga gtacctctg cagccaccat cgtctactag cgtaccaccc	1860
acgtccactc acatcatatg ccgcccagc cccccggact gattccgcgc tattgttgag	1920
atataagagg agtggtcgaa cggaccaagg agccataatc ccctogagca ttctogagac	1980
ctctccccac tgaactcctt cgcgctcacc aaaaaacctc gcgtagatgt cactctcat	2040
cgttactggg cctgtaggag gtcagactga gggcgctcct gctcccaacc gcctcgaaat	2100
caacgacttc gtcaagaatg aggagttctt ctgcgtttac gtccaggctc tcgggtgcgtc	2160
gccttggcac atgtatgctc acccctatta ccatgaagct catgagccct cactacatac	2220
agatatcatg tatggactga agcaggagga actgatctcg ttcttccaga tcgggtggcat	2280
tcattgattg ccatacgttg cctggagtga tgccggagcg gatgacctg ctgagccgtc	2340
cgggtactgt acccatggct ccgtactgtt cccgacctgg cataggcctt acgtcgccact	2400
atatgaggta agcagcttgc tagatcagac cgctacggac gacgctgaga ctcaaaatgg	2460
ctacagcaaa tcttgacaaa gtatgctgga gagatcgctg ataagtacac ggtcgacaaa	2520
ccgcgttggc agaaggcagc ggccgacctg cgccaacctt tctgggactg ggccaagaac	2580
acgtgcctc ctctgaagt catctctctc gacaaagtca cgattacgac accagatgga	2640
cagaggacgc aagttgacaa tccactccgt cgctaccgct tccatccgat cgacccccagc	2700
ttcccagagc catacagcaa ctggccagcg aactgagac atccgacaag tgatgggtcg	2760
gatgccaaag acaacgtgaa ggatctcact acgtaagcca attcgccata aagacgtcc	2820
tccattcatc tcaatgtata tatgtgacag tactctgaag gcggaccagc ctgatatac	2880

- 20 -

gacgaagacg tataatctat tgaccagagt gcacacgtgg ccggcggttca gcaaccacac 2940
 tccaggcgat ggcggcagct ccagtaacag tcttgaggcc attcacgacc acatccatga 3000
 ctcagttggc ggcggaggcc agatgggaga cccgtccgtg gcaggatatgt gaagtgattc 3060
 ttogcgagag acgtgactta catgtccttg taggcttcga cccaatcttc ttctgcacc 3120
 attgccaaagt tgatcgtctt cttgcaactgt ggtccgcctt gaaccccggc gtgtgggtca 3180
 acagctctag ctccgaagat ggcacctaca cgatcccgcc tgactctacc gtggacccaaa 3240
 ctactgggtg gttcccgcac agctgtgccc tgtggagtcg ccgttgactt ccatcactct 3300
 cagcattgac gcccttcttg gatacccaaa gcacattctg gacgtccttc cagtctgctg 3360
 gagtctcgcc cagccaattt ggctattctt accccgagtt taacggctct aacctgcaag 3420
 atcagaaggc tgtgaaagat cacatcgccg aggtcgtgaa cgagctctac ggtcatcgca 3480
 tgccgaaaac cttccctttc cccagctcc aggcagtttc cgtagccaag cagggcgacg 3540
 ccgtcactcc atccgtggct accgattcag tgtcgtcttc taccacacct gccgaaaatc 3600
 ccgcatcccg cgaggatgcc tctgataagg acacagagcc gacgctcaat gtagaggttg 3660
 ccgcgccagg cgcgcacttg acctccacca agtattggga ctggactgct cgcattcatg 3720
 tcaagaagta cgaagtcgga ggcagcttca gcgtcctgct cttcctgggt gcaatccccg 3780
 agaaccacgc ggattggcgc acgagcccca actacgttgg cggatcatcat gctttcgtga 3840
 atagctcacc gcagcgctgc gctaactgcc gtgggtcaagg cgacctgtc atcgaaggct 3900
 tcgtccatct caacgaggcg atcgcccgcc atgcgcacct cgaactcttc gatccaaccg 3960
 tcgtgaggcc gtacctcacg cgcgagttgc actgggggtg gatgaaggtc agtgcctaca 4020
 ctctgcatac gaccgtatat gtcgctaatt agatctatca aggtgaatgg caccgtcgtg 4080
 cccctgcaag acgtcccgtc gtcgaggtt gtcgtcctct caactcctct tacccttctt 4140
 ccgggagagc cattccctgt ccccggaacg cccgtcaatc atcatgacat caccatgga 4200
 cgtcctgggtg gctctacca cacgcactaa gcatgctgat ggctgcccc tattgattaa 4260
 acacgagtcg acctgagaac acatacaatg gatgtaatca tacttcactt ttgatgacaa 4320
 tcgcttcac attctgttcc tagcgggaca gataaccag tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4380
 aaaacactgt catgc 4395

<210> 16
 <211> 618
 <212> PRT
 <213> *Pycnopus sanguineus*

<400> 16

Met Ser His Phe Ile Val Thr Gly Pro Val Gly Gly Gln Thr Glu Gly
 1 5 10 15

- 21 -

Ala Pro Ala Pro Asn Arg Leu Glu Ile Asn Asp Phe Val Lys Asn Glu
20 25 30

Glu Phe Phe Ser Leu Tyr Val Gln Ala Leu Asp Ile Met Tyr Gly Leu
35 40 45

Lys Gln Glu Glu Leu Ile Ser Phe Phe Gln Ile Gly Gly Ile His Gly
50 55 60

Leu Pro Tyr Val Ala Trp Ser Asp Ala Gly Ala Asp Asp Pro Ala Glu
65 70 75 80

Pro Ser Gly Tyr Cys Thr His Gly Ser Val Leu Phe Pro Thr Trp His
85 90 95

Arg Pro Tyr Val Ala Leu Tyr Glu Gln Ile Leu His Lys Tyr Ala Gly
100 105 110

Glu Ile Ala Asp Lys Tyr Thr Val Asp Lys Pro Arg Trp Gln Lys Ala
115 120 125

Ala Ala Asp Leu Arg Gln Pro Phe Trp Asp Trp Ala Lys Asn Thr Leu
130 135 140

Pro Pro Pro Glu Val Ile Ser Leu Asp Lys Val Thr Ile Thr Thr Pro
145 150 155 160

Asp Gly Gln Arg Thr Gln Val Asp Asn Pro Leu Arg Arg Tyr Arg Phe
165 170 175

His Pro Ile Asp Pro Ser Phe Pro Glu Pro Tyr Ser Asn Trp Pro Ala
180 185 190

Thr Leu Arg His Pro Thr Ser Asp Gly Ser Asp Ala Lys Asp Asn Val
195 200 205

Lys Asp Leu Thr Thr Thr Leu Lys Ala Asp Gln Pro Asp Ile Thr Thr
210 215 220

Lys Thr Tyr Asn Leu Leu Thr Arg Val His Thr Trp Pro Ala Phe Ser
225 230 235 240

Asn His Thr Pro Gly Asp Gly Gly Ser Ser Ser Asn Ser Leu Glu Ala
245 250 255

Ile His Asp His Ile His Asp Ser Val Gly Gly Gly Gly Gln Met Gly
260 265 270

Asp Pro Ser Val Ala Gly Phe Asp Pro Ile Phe Phe Leu His His Cys

- 22 -

275

280

285

Gln Val Asp Arg Leu Leu Ala Leu Trp Ser Ala Leu Asn Pro Gly Val
 290 295 300

Trp Val Asn Ser Ser Ser Ser Glu Asp Gly Thr Tyr Thr Ile Pro Pro
 305 310 315 320

Asp Ser Thr Val Asp Gln Thr Thr Ala Leu Thr Pro Phe Trp Asp Thr
 325 330 335

Gln Ser Thr Phe Trp Thr Ser Phe Gln Ser Ala Gly Val Ser Pro Ser
 340 345 350

Gln Phe Gly Tyr Ser Tyr Pro Glu Phe Asn Gly Leu Asn Leu Gln Asp
 355 360 365

Gln Lys Ala Val Lys Asp His Ile Ala Glu Val Val Asn Glu Leu Tyr
 370 375 380

Gly His Arg Met Arg Lys Thr Phe Pro Phe Pro Gln Leu Gln Ala Val
 385 390 395 400

Ser Val Ala Lys Gln Gly Asp Ala Val Thr Pro Ser Val Ala Thr Asp
 405 410 415

Ser Val Ser Ser Ser Thr Thr Pro Ala Glu Asn Pro Ala Ser Arg Glu
 420 425 430

Asp Ala Ser Asp Lys Asp Thr Glu Pro Thr Leu Asn Val Glu Val Ala
 435 440 445

Ala Pro Gly Ala His Leu Thr Ser Thr Lys Tyr Trp Asp Trp Thr Ala
 450 455 460

Arg Ile His Val Lys Lys Tyr Glu Val Gly Gly Ser Phe Ser Val Leu
 465 470 475 480

Leu Phe Leu Gly Ala Ile Pro Glu Asn Pro Ala Asp Trp Arg Thr Ser
 485 490 495

Pro Asn Tyr Val Gly Gly His His Ala Phe Val Asn Ser Ser Pro Gln
 500 505 510

Arg Cys Ala Asn Cys Arg Gly Gln Gly Asp Leu Val Ile Glu Gly Phe
 515 520 525

Val His Leu Asn Glu Ala Ile Ala Arg His Ala His Leu Asp Ser Phe
 530 535 540

- 23 -

Asp Pro Thr Val Val Arg Pro Tyr Leu Thr Arg Glu Leu His Trp Gly
545 550 555 560

Val Met Lys Val Asn Gly Thr Val Val Pro Leu Gln Asp Val Pro Ser
565 570 575

Leu Glu Val Val Val Leu Ser Thr Pro Leu Thr Leu Pro Pro Gly Glu
580 585 590

Pro Phe Pro Val Pro Gly Thr Pro Val Asn His His Asp Ile Thr His
595 600 605

Gly Arg Pro Gly Gly Ser His His Thr His
610 615

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.